



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Síntese de ligandos do G-quadruplex e sua avaliação em células cancerígenas

**Sara Raquel Lopes Cegonho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Carla Cruz  
Co-orientador: Prof. Doutor Graça Baltazar

Covilhã, 2 de outubro de 2015



## Agradecimentos

A realização desta dissertação corresponde não só à conclusão de uma etapa da minha vida acadêmica mas também à materialização de um sonho pessoal. Como tal, gostaria de demonstrar aqui o meu profundo agradecimento a todos os que, de alguma forma, apoiaram e tornaram a realização deste trabalho possível.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Carla Cruz pela possibilidade de desenvolver este projeto sob a sua orientação. Agradeço toda a confiança depositada em mim, assim como todo o tempo investido na minha aprendizagem. Só assim foi possível crescer e evoluir ao longo deste ano. Obrigado não só por me colocar perante novos desafios mas também por me ajudar a superá-los.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Graça Baltazar por toda a ajuda, confiança e orientação científica que me transmitiu. Agradeço a disponibilidade que demonstrou ao longo deste ano para responder a todas as questões direcionando-me de forma a atingir os objetivos definidos.

Ao Professor Doutor Samuel Silvestre por toda a ajuda, disponibilidade demonstrada e colaboração no trabalho realizado.

A todos os meus colegas de laboratório, pela constante permuta de conhecimentos, palavras de ânimo e companheirismo. Um especial obrigado à Filipa pela disponibilidade imediata e ajuda no início deste desafio.

Agradeço também aos meus pais e restante família pois eles possibilitaram e apoiaram a minha continuidade neste ciclo de estudos. Obrigado pelo amor incondicional, pela forma como me educaram e pelos ensinamentos que fazem de mim o que sou hoje. Por me ajudarem ao longo de todos estes anos, por serem o meu suporte e por acreditarem em mim e nas minhas capacidades.

Aos meus amigos e amigas, por estarem sempre presentes, pela alegria transmitida e pelas histórias e momentos vividos. Serão recordados com enorme nostalgia e carinho.

Ao João, o meu namorado, por ser o meu confidente, por me incentivar incessantemente a fazer mais e melhor e a nunca desistir dos meus sonhos. Obrigado sobretudo pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis.

Síntese de ligandos do G-quadruplex e a sua avaliação em células cancerígenas

Um obrigado também a todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram e facilitaram a concretização deste trabalho.

A todos vós, Bem-haja.

## Resumo

O G-quadruplex é uma estrutura formada por sequências ricas em guaninas presentes em zonas do DNA com significância biológica tais como os telómeros, regiões de troca de imunoglobulinas e promotores de oncogenes. A indução e/ou a estabilização desta estrutura por moléculas de baixo peso molecular (<500 Da) tem um efeito a nível anti proliferativo através da inibição da expressão de proto-oncogenes ou da atividade da telomerase. Os ácidos biliares são derivados do colesterol sintetizados no fígado e excretados no trato digestivo. Estas moléculas interagem a nível da absorção das gorduras e demonstraram ter diferentes características e efeitos biológicos. Deste modo, vários derivados do ácido litocólico foram sintetizados para interagirem com estruturas do G-quadruplex e estudar o seu potencial efeito inibitório através da redução da proliferação de células cancerígenas.

Os compostos foram preparados por redução *in situ* do ácido litocólico ao seu álcool primário que, através da reação de Mitsunobu, foi convertido num haleto de arila ativado sofrendo posteriormente substituição nucleofílica por diferentes poliaminas.

A interação/estabilização dos compostos sintetizados com sequências formadoras de G-quadruplex *c-MYC* e *Tel122* foi analisada por FRET-*melting* e CD-*melting*. Foram também realizados ensaios de viabilidade celular usando diferentes linhas celulares tumorais - LNCaP, MCF-7 and U-87, e células não tumorais da derme NHDF.

Dos compostos sintetizados, os compostos SCDiol, SCDib e SCM5 diminuíram a viabilidade celular de modo dependente da concentração. Os estudos de CD e de FRET evidenciaram interação do composto SCM3 com o G-quadruplex telomérico *Tel122* com topologia híbrida e com o G-quadruplex paralelo do *c-MYC*. Atualmente, os compostos demonstraram ser potenciais anticancerígenos, contudo, mais estudos são necessários para compreender o seu mecanismo de atuação, relação com G-quadruplex e o seu potencial interesse terapêutico para a indústria farmacêutica.

## Palavras-chave

G-quadruplex, derivados do ácido litocólico, inibição proliferação celular, cancro



## Abstract

G-quadruplex is a four stranded structure composed by a guanine-rich sequence and is present in DNA regions with high biological significance, such as telomeres, immunoglobulin switch regions and gene promoters. The induction or stabilization of G-quadruplexes by small molecules (<500 Da) seems to display anti-proliferative activity due to inhibition of proto-oncogene expression and telomerase activity. Bile acids are derivatives of cholesterol that are synthesized in the liver and excreted into the digestive tract, where they aid in the absorption of dietary fats. Previous studies suggesting that each bile acid or derivative showed distinct and characteristic biological effects. In this context, several bile acid derivatives have been synthesized to explore their potential to inhibit or reduce tumor cell proliferation.

This compounds were prepared *in situ* from the reduction of lithocholic acid to the primary alcohol which were converted into aryl halide using the Mitsunobu reaction. This intermediate was then coupled with several polyamines by nucleophilic substitution.

The interaction/stabilization of the synthesized compounds were screened to G-quadruplex former sequences *c-MYC* e *Tel22* by FRET-*melting* and CD-*melting*. The cellular viability was also evaluated in presence of these compounds using different cancer cell lines such as LNCaP, MCF-7 and U-87, and also in a non-tumoral cell line, NHDF, in order to determine selective cytotoxic effects.

Within the synthesized compounds SCDiol, SCDib e SCM5 decreased cell viability in a concentration-dependent manner. CD studies and FRET assay show interaction between SCM3 and hybrid telomeric *Tel22* G-quadruplex and parallel quadruplex in *c-MYC*. However, further studies must be performed to relate the cell effects to the G-quadruplex mechanism. At this point additional studies are necessary to explore compounds mechanism and *in vitro* relation to G-quadruplex structures and well as potential therapeutic interest for the pharmaceutical industry.

## Keywords

G-quadruplex, lithocholic acid derivatives, cell proliferation inhibition, cancer





# Índice

Capítulo 1 - Introdução .....	1
1.1 - DNA G-Quadruplex .....	1
1.2 - G-quadruplex: Métodos para o seu estudo .....	2
1.2.1 - Ressonância magnética nuclear - RMN.....	3
1.2.2 - Dicroísmo circular - CD .....	4
1.2.2.1 - CD- <i>melting</i> .....	5
1.2.3 - FRET- <i>melting</i> .....	5
1.2.4 - G4-FID .....	6
1.3 - Importância do G-Quadruplex no genoma Humano .....	7
1.3.1 - G-quadruplex: Telômeros e Telomerase .....	7
1.3.2 - G-quadruplex na regulação da transcrição: promotores de oncogenes.....	10
1.3.2.1 - <i>c-MYC</i> .....	10
1.4 - Ligandos do G-quadruplex.....	12
1.4.1 - Porfirina - TMPyP <sub>4</sub> .....	12
1.4.2 -Telomestatina.....	13
1.4.3 - Quarfloxina (CX-3543) .....	14
1.5.1 - Esteroides e G-quadruplex.....	16
Capítulo 2 - Objetivos.....	19
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	21
3.1 - Síntese Química .....	21
3.1.1 - Reagentes e solventes .....	21
3.1.2 - Equipamentos .....	21
3.1.3 - Procedimentos cromatográficos .....	21
3.1.4 - Procedimentos experimentais.....	22
3.1.4.1 - Síntese de SCDiol .....	22
3.1.4.2 - Síntese de SCSMonobromo: .....	23

3.1.4.3 - Síntese de SCDib.....	24
3.1.4.4 - Síntese de Macrociclos .....	25
3.2 - Técnicas de cultura celular .....	27
3.2.1- Linhas Celulares .....	27
3.2.2 - Cultura e manutenção das linhas celulares .....	28
3.2.3 - Preparação dos Meios de Cultura .....	28
3.2.4 - Descongelamento .....	29
3.2.5 - Tripsinização .....	30
3.2.6 - Contagem e sementeira de células .....	30
3.2.7 - Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular.....	31
3.2.8 - Ensaio de proliferação celular-MTT .....	32
3.2.9 - Análise Estatística .....	33
3.2.10 - Ensaio de Fluorescência .....	34
3.3 - Ensaio de dicroísmo circular (CD).....	34
3.4 - Ensaio FRET .....	35
Capítulo 4 - Resultados e Discussão .....	37
4.1 - Síntese Química .....	37
4.2- Avaliação da formação de estruturas de G-quadruplex: dicroísmo circular.....	37
4.2.1. - Interação de estruturas do G-quadruplex com os compostos sintetizados.....	39
4.3 - Avaliação Biológica .....	45
4.3.1 - Análise da citotoxicidade em células U-87, MCF-7, LNCaP e NHDF.....	45
4.3.2 - Determinação do IC <sub>50</sub> .....	46
4.4 - Ensaio de Fluorescência .....	50
4.4.1 - Avaliação da morte celular por ensaios de imunofluorescência .....	51
Capítulo 5 - Conclusão .....	53
Capítulo 6 - Perspetivas Futuras .....	55
Bibliografia.....	57

## Lista de Figuras

Figura 1 - Formação do G-Quadruplex: (A) - Tétrada formado por ligações de <i>Hoogsteen</i> entre quatro guaninas; (B) - Estrutura esquemática do G-Quadruplex; (C) - Interações eletrostáticas entre o catião e os átomos de oxigênio de dois tétradas. ....	1
Figura 2 - Topologias do G-quadruplex: Diferentes topologias consoante as cadeias constituintes: (A) Tetramolecular, (B) bimolecular, (C-F) intramolecular; Diferentes topologias de <i>loop</i> : (B, C) <i>loop</i> lateral (D) “ <i>reverse</i> ” <i>loops</i> de duas cadeias, (E) dois <i>loops</i> laterais e um diagonal; Diferentes topologias consoante a orientação das cadeias: (A) paralelo - todas as cadeias tem a mesma direção, (B) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a uma paralela e a outra antiparalela, (C) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a duas cadeias antiparalelas, (F) antiparalelo, três cadeias na mesma direção. ....	2
Figura 3 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H, representando os prótons imino, amino e bases da sequência d(GCGGTCGGA) <sub>4</sub> .....	3
Figura 4 - Representação esquemática da avaliação da temperatura de <i>melting</i> usando CD. A temperatura de <i>melting</i> ( <i>T</i> <sub>1/2</sub> ) aumenta quando o G-quadruplex é estabilizado por um ligando.....	5
Figura 5 - Representação esquemática do procedimento experimental para determinação da temperatura de <i>melting</i> / efeito estabilizador de ligandos .....	6
Figura 6 - Representação esquemática do método G4-FID. Este método baseia-se na diminuição da fluorescência pelo deslocamento do laranja de tiazol do complexo tiazol-DNA. 7	7
Figura 7 - Significância biológica do DNA telomérico e telomerase: diferença entre células normais e células cancerígenas. A presença de G-quadruplex consegue inibir a atividade da telomerase. Na figura está representado o DNA telomérico e o G-quadruplex. As bases timina, adenina e guanina estão representadas a azul, vermelho e verde respetivamente. ....	9
Figura 8 - Modelo representativo da ativação ou silenciamento da transcrição génica. Interação entre a estrutura G-quadruplex e um ligando. O ligando estabiliza a estrutura da forma silenciada do gene pela inibição da conversão na forma ativa.....	11
Figura 9 - Estrutura da 5,10,15,20-tetra-( <i>N</i> -metil-4-piridilo)porfirina (TMPyP <sub>4</sub> ).. ....	13
Figura 10 - Estrutura da telomestatina. ....	14
Figura 11 - Estrutura da quarfloxina CX-3543.....	15
Figura 12 - Estrutura base das moléculas de esteroides. ....	15
Figura 13 - Esquema geral das reações de síntese dos derivados de ácido litocólico .....	17
Figura 14 - Esquema representativo da microplaca para o ensaio de <i>screening</i> dos compostos numa concentração de 30µM. (Z=Zero; C=Controlo; AL=Ácido litocólico; D=Diol; Dib=Dibromo;SCM2, SCM3, SCM5 (Compostos SCM2 a SCM5); DMSO= dimetilsulfóxido). ....	31

Figura 15 - Esquema representativo das microplacas para o ensaio da determinação do IC <sub>50</sub> . Curva concentração-resposta, com uma gama de diferentes concentrações (0.01µM a 100µM). Foram realizados ensaios com n=5 para todas as concentrações, zero e controlo, em células MCF-7, LNCaP e U-87.....	32
Figura 16 - Espectro dicroísmo circular da sequência c-MYC (5 µM) em solução de 100mM de KCl a 25°C .....	38
Figura 17 - Espectro dicroísmo circular da sequência Tell22 (10µM) em solução de 100mM de KCl a 25°C. ....	38
Figura 18 - Espectro dicroísmo circular da sequência Tell22 (10µM) em solução de 100mM de NaCl a 25°C. ....	39
Figura 19- Espectro dicroísmo circular da sequência c-MYC (5µM) e c-MYC (5µM) + 8 equivalentes de composto SCM2 em solução de 100mM de KCl a 25°C. ....	40
Figura 20 - Espectro dicroísmo circular da sequência c-MYC (5µM) e c-MYC (5µM) + 5 equivalentes de composto SCM3 em solução de 100mM de KCl a 25°C. ....	40
Figura 21 - Espectro dicroísmo circular da sequência Tell22 (10µM) e Tell22 (10µM) + 8 equivalentes de composto SCM2 em solução de 100mM de NaCl a 25°C.....	41
Figura 22 - Espectro dicroísmo circular da sequência Tell22 (10µM) e Tell22 (10µM) + 5 equivalentes de composto SCM3 em solução de 100mM de KCl a 25°C. ....	41
Figura 23 - Curva de <i>melting</i> obtida por dicroísmo circular. Sequência Tell22 G-quadruplex na presença e na ausência de 5 equivalentes do ligando SCM3. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 294nm. Tell22 + 0eq de SCM3 T <sub>m</sub> =74,24°C; Tell22 + 5eq de SCM3=76,0°C.42	
Figura 24 - Curva de <i>melting</i> obtida por dicroísmo circular. Sequência c-MYC G-quadruplex na presença e na ausência de 5 equivalentes do ligando SCM3. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 264nm. C-MYC + 0eq de SCM3 T <sub>m</sub> =51,79°C; c-MYC + 5eq de SCM3=54,78°C. ....	42
Figura 25 - Curva de <i>melting</i> obtida por dicroísmo circular. Sequência Tell22 G-quadruplex na presença e na ausência de 8 equivalentes do ligando SCM2. Amostra preparada em NaCl. Leitura efetuada a 264nm. Tell22 + 0eq de SCM2 T <sub>m</sub> =54,30°C; Tell22 + 8eq de SCM3=54,74°C. ....	43
Figura 26 - Curva de <i>melting</i> obtida por dicroísmo circular. Sequência c-MYC G-quadruplex na presença e na ausência de 8 equivalentes do ligando SCM2. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 264nm. C-MYC + 0eq de SCM2 T <sub>m</sub> =55,33°C; c-MYC + 8eq de SCM3=55,99°C. ....	43
Figura 27 - Ensaio FRET <i>melting</i> . Sequência Tell21 (0,2µM) em tampão Li <sup>+</sup> cacodilato10mM com 10mM de KCl+90mM LiCl, pH7,2.....	44
Figura 28 - Avaliação da proliferação celular por ensaio MTT - utilizando os intermediários da síntese dos macrociclos. Percentagens da proliferação celular em relação ao controlo (na ausência de qualquer composto) nas diferentes linhas celulares, após tratamento com os compostos precursores de macrociclos (30µM) durante 72 horas. Os resultados representam a média ± SEM. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste <i>t-student</i> ). Ensaios em cinco	

preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).  
 ..... 45

Figura 29 - Avaliação da proliferação celular por ensaio MTT - utilizando os macrociclos. Percentagens da proliferação celular em relação ao controlo (na ausência de qualquer composto) nas diferentes linhas celulares, após tratamento com os macrociclos (30µM) durante 72 horas. Os resultados representam a média ± SEM. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL). ..... 46

Figura 30 - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCDiol em concentrações entre 0,01µM e 100µM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL). ..... 47

Figura 31 - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCDib em concentrações entre 0,01µM e 100µM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p < 0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL). ..... 48

Figura 32 - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCM5 em concentrações entre 0,01µM e 100µM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p < 0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL). ..... 49

Figura 33 - Imagens de Fluorescência dos núcleos de células MCF-7: marcador Hoechst (1 µM, for 15 min). A - Células controlo (ausência de qualquer composto); B - células após incubação com SCM3 (30 µM, 72h). ..... 51



## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características do Meio de Cultivo das linhas celulares: tipo, características e suplementos adicionados a cada meio utilizado para linhas celulares utilizadas em estudo: U-87, MCF-7 e LNCaP.....	29
Tabela 2 - Sondas utilizadas para a co-localização dos compostos nas células.....	34
Tabela 3 - Valores de IC50 dos compostos SCDiol, SCDib e SCM5 em linhas de células MCF-7, LNCaP e U- .....	50
Tabela 4 - Valores de excitação e emissão máxima dos compostos sintetizados SCDib, SCM2, SCM3 e SCM5.....	50





## Lista de Acrónimos

A	Adenina
ALT	Aumento alternativo dos telómeros
C	Citosina
CD	Dicroísmo Circular
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformio Deutrado
CX-3543	Quarfloxina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAM	6-carboxifluoresceína
FG	Funtumina guanilhidrazona
FID	<i>Fluorescent intercalator displacement</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanina
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto necessária para a inibição da atividade enzimática em 50%
LNCaP	<i>(Lymph node carcinoma of the prostate)</i> - Células cancerígenas da próstata
M	Molar
MCF-7	<i>(Michigan Cancer Foundation-7)</i> - Células cancerígenas da mama
NHDF	<i>(Normal human dermal fibroblasts)</i> - Células normais dos fibroblastos da derme humana
nm	Nanómetros
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
STD	<i>Saturation Transfer Diference</i>
T	Timina
T <sub>1/2</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
TAMRA	carboxitetrametilrodamina

<b>TMPyP4</b>	Porfirina
<b>TSSs</b>	Zonas de início de transcrição
<b>U-87</b>	Células cancerígenas de glioma humano
<b>μM</b>	Micro molar

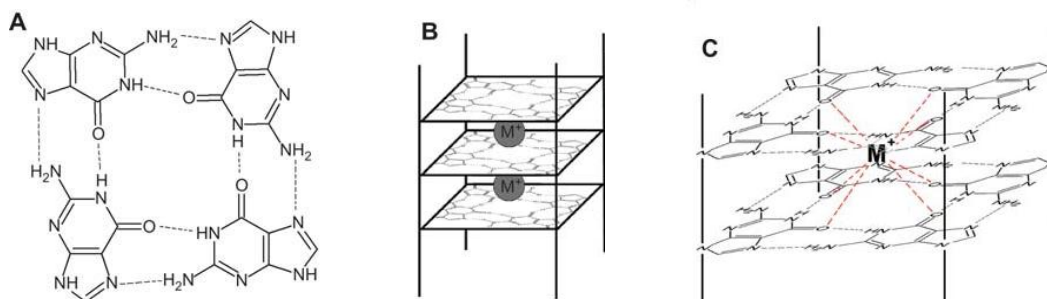
# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1 - DNA G-Quadruplex

Desde 1953 é sabido que o DNA consiste em duas cadeias helicoidais, enroladas ao longo de um eixo, formando uma dupla hélice rotacional à direita. É um longo polímero constituído por nucleótidos cuja cadeia principal é formada por moléculas de açúcar e fosfato unidos por ligações fosfodiéster. À molécula de açúcar encontra-se ligada uma de quatro bases nitrogenadas (A,T,C ou G). A dupla hélice é estabilizada por pontes de hidrogénio estabelecidas entre as bases de cada uma das cadeias. Esta conformação denomina-se B-DNA e é a forma mais prevalente<sup>(1)</sup>.

O DNA pode adotar diferentes conformações, não só através de interações com moléculas e/ou proteínas, como também devido à presença de determinadas sequências nucleotídicas<sup>(2)</sup>. Com o crescente interesse e investigação destas conformações e estruturas alternativas, surge a hipótese destas desempenharem papéis fundamentais em inúmeros processos *in vivo*.

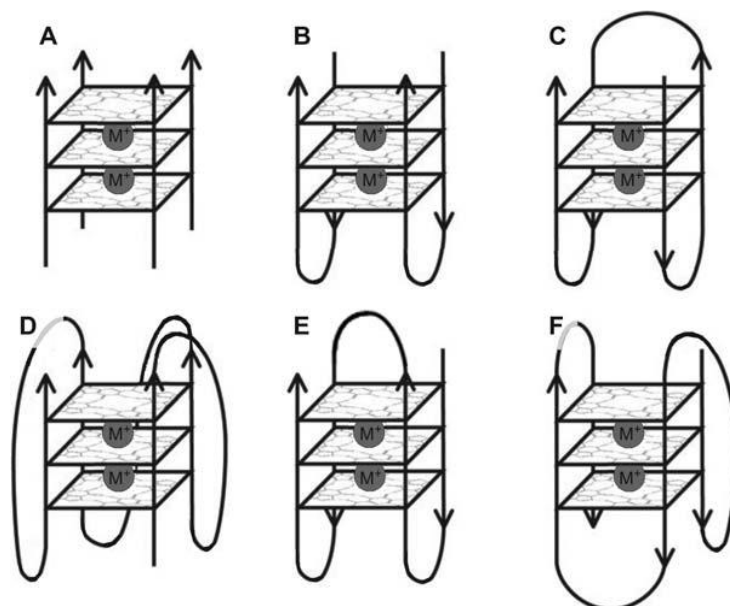
Uma das conformações alternativas passível de ser adotada por sequências ricas em guaninas (G) designa-se G-quadruplex. Esta estrutura baseia-se na formação de ligações de hidrogénio (ligações de *Hoogsteen*) entre quatro guaninas de cadeias diferentes ou de várias frações da mesma cadeia (Figura 1 A). Estes quartetos de guaninas, podem então interagir entre si através de interações  $\pi$ - $\pi$  formando arranjos empilhados denominados G-quadruplex (Figura 1 B)<sup>(3, 4)</sup>. Os G-quadruplexes são estabilizados por catiões monovalentes que se localizam no centro e interagem electrostaticamente com os átomos de oxigénio (Figura 1 C). Dos catiões capazes de possibilitar esta estabilização destacam-se o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$  sendo que diferentes catiões poderão promover diferentes topologias de G-quadruplex<sup>(5)</sup>.



**Figura 1** - Formação do G-Quadruplex: (A) - Tétrada formado por ligações de *Hoogsteen* entre quatro guaninas; (B) - Estrutura esquemática do G-Quadruplex; (C) - Interações eletrostáticas entre o catião e os átomos de oxigénio de dois tétradas. (Imagem adaptada de Konig, S.L.B., A.C. Evans, and J.L. Huppert, *Seven essential questions on G-quadruplexes*. BioMol Concepts, 2010. 1: p. 17.)

O DNA G-quadruplex pode ter várias topologias e estas podem ser enquadradas em categorias de acordo com um conjunto de fatores (Figura 2). Assim sendo, os G-quadruplex são classificados como intramoleculares quando formados por seqüências da mesma cadeia ou intermoleculares quando são constituídos por várias (duas ou quatro) cadeias. Para além disto, de acordo com a orientação das cadeias que os compõem podem ser classificados como paralelos, antiparalelos ou híbridos<sup>(3, 5)</sup>.

O G-quadruplex intramolecular é formado por uma única cadeia de DNA geralmente com seqüências  $G_{23}N_xG_{23}N_xG_{23}N_x$ . Este tipo específico (como veremos mais a frente) desperta maior interesse pois tem maior probabilidade de se formar nos telómeros (seqüência TTAGGG), nos promotores de oncogenes e outras regiões relevantes do genoma humano. Estas estruturas formam-se rapidamente, apresentam várias topologias e por isto poderão ser especificamente reconhecidas por proteínas ou ligandos<sup>(3, 6)</sup>.



**Figura 2** - Topologias do G-quadruplex: Diferentes topologias consoante as cadeias constituintes: (A) Tetramolecular, (B) bimolecular, (C-F) intramolecular; Diferentes topologias de *loop*: (B, C) *loop* lateral (D) “reverse” *loops* de duas cadeias, (E) dois *loops* laterais e um diagonal; Diferentes topologias consoante a orientação das cadeias: (A) paralelo - todas as cadeias tem a mesma direção, (B) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a uma paralela e a outra antiparalela, (C) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a duas cadeias antiparalelas, (F) antiparalelo, três cadeias na mesma direção. (Imagem adaptada de König, S.L.B., A.C. Evans, and J.L. Huppert, *Seven essential questions on G-quadruplexes*. BioMol Concepts, 2010. 1: p. 17.)

## 1.2 - G-quadruplex: Métodos para o seu estudo

Várias técnicas experimentais têm sido desenvolvidas para o estudo do G-quadruplex tais como, cristalografia de raios - X, espectroscopia de RMN ou dicroísmo circular (CD) que permitem a estudar o tipo de tipologia do G-quadruplex. Por outro lado, de modo a complementar estes resultados, pode recorrer-se a outras técnicas como por exemplo,

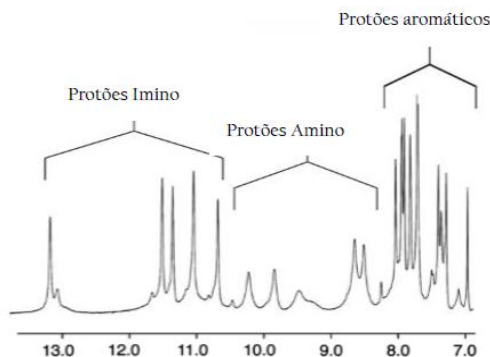
eletroforese, cromatografia ou espectrometria de massa que fornecem informação acerca do tamanho molecular. Para além disto, este conjunto de técnicas têm sido utilizado também para o estudo de interações do DNA G-quadruplex com diferentes ligandos. Deste modo, é possível retirar um conjunto de informações como por exemplo a afinidade do ligando, locais de ligação envolvidos na interação ou a alteração da conformação<sup>(7)</sup>.

Nas próximas secções serão descritas algumas das técnicas incluindo as utilizadas no desenvolvimento do presente trabalho.

### 1.2.1 - Ressonância magnética nuclear - RMN

Na última década a ressonância magnética nuclear (RMN) têm-se destacado em inúmeras áreas sendo frequentemente utilizada para obter informação estrutural de moléculas e biomoléculas. É uma técnica utilizada no estudo de estruturas G-quadruplex permitindo determinar a estrutura atômica, dinâmica, estabilidade e interações com ligandos<sup>(8)</sup>.

Tradicionalmente o processo de determinação da estrutura é baseado na interpretação da magnetização transferida entre protões através do espaço mediada por átomos de carbono, azoto e fósforo<sup>(9)</sup>.



**Figura 3** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , representando os protões imino, amino e bases da sequência d(GCGGTCGGA)<sub>4</sub>. (Imagem adaptada de Webba da Silva, M., *NMR methods for studying quadruplex nucleic acids*. *Methods*, 2007. 43(4): p. 264-77.

A concentração de amostra usada em solução nestes estudos é normalmente entre 1 e 3 mM e é preparada em H<sub>2</sub>O juntamente com o catião desejado e sob condições de pH desejadas. A formação de tétradas dá origem a protões imino característicos, que exibem um desvio químico entre 10 - 12ppm, quando comparados com os desvios normais do DNA duplex a 13 - 14ppm. As interações entre ligandos e as estruturas do G-quadruplex podem ser determinadas por experiências bidimensionais de NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) e STD

(*Saturation Transfer Diference*), permitindo identificar os prótons do ligando que interagem com o G-quadruplex<sup>(8, 9)</sup>.

### 1.2.2 - Dicroísmo circular - CD

Algumas moléculas não apresentam uma estrutura simétrica o que significa que estas não são sobreponíveis com a sua imagem no espelho. Tais moléculas são denominadas quirais e possuem características únicas. A interação de luz polarizada com estas moléculas é muito específica e revelou-se um método importante para a sua caracterização<sup>(10)</sup>.

O método típico utilizado para avaliar os efeitos da luz polarizada neste tipo de moléculas é o dicroísmo circular - (CD). O dicroísmo pode ser definido como uma propriedade de algumas moléculas tem de absorver a luz em diferentes extensões dependendo da forma de polarização do feixe incidente. Quando a absorção da luz circularmente polarizada numa direção (direita) é diferente da absorção da luz circularmente polarizada da direção oposta (esquerda), pode afirmar-se que a molécula exhibe dicroísmo circular. O dicroísmo circular pode fornecer detalhadamente a estrutura e outras informações de inúmeras moléculas como por exemplo proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, fármacos entre outros. Para além disto, quaisquer alterações conformacionais na estrutura destas também podem ser avaliadas<sup>(10)</sup>.

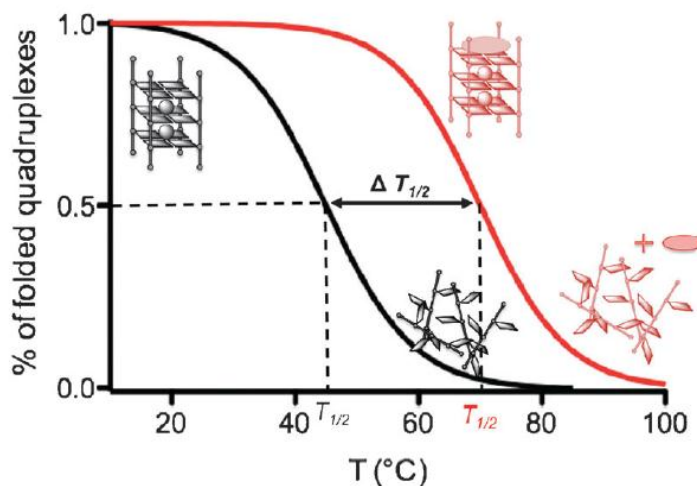
O CD quando associado a outras técnicas (espectroscopia de RMN), torna-se uma técnica importante para o estudo de estruturas do G-quadruplex. É um método simples, rápido e relativamente económico que permite comparar espectros de DNA comparando-as e determinando a presença de motivos, ou interações do DNA com fármacos e proteínas. É uma técnica muito sensível e por isso requer pequenas quantidades (5µM- 10µM) de amostra que podem ser preparadas/analizadas sob diferentes condições de temperatura, pH e solventes<sup>(11)</sup>.

Como mencionado anteriormente, sequências de oligonucleotídeos ricas em guaninas podem favorecer a formação de G-quadruplex em diferentes topologias. O espectro de CD de um G-quadruplex na topologia paralela é caracterizado por uma banda negativa a 240nm e uma banda positiva a 260nm. Por outro lado, na topologia anti paralela está presente uma banda negativa a 260nm e uma positiva a 295nm<sup>(5, 11)</sup>. Como podemos observar, as estruturas dos G-quadruplexes são polimorfos devido à possibilidade de associarem a vários tipos de moléculas, à orientação das guaninas ou às várias geometrias e topologias de *loops*. Por conseguinte, cada topologia possui um espectro típico de CD<sup>(11)</sup>.

### 1.2.2.1 - CD-melting

Quando medida a absorvância dos ácidos nucleicos a 260nm podemos observar valores relativamente baixos no DNA estruturado. Contudo, quando este é desnaturado pelo calor, demonstra um aumento na sua absorvância. Esta tipo de procedimento é utilizado muitas vezes para demonstrar a estabilização ou destabilização do DNA duplex por um ligando. A preparação da amostra é relativamente simples e a quantidade necessária é pequena. Quando à análise qualitativa dos dados basta compreender que um aumento na temperatura de *melting* ( $T_{1/2}$ ) indica uma maior preferência do ligando pela cadeia dupla em relação à cadeia simples. Um método utilizado para esta medição da temperatura de *melting* é o dicroísmo circular (descrito anteriormente).

O presente método pode ser também adaptado para estruturas de G-quadruplex sendo que neste caso os sinais do G-quadruplex são medidos a 260nm e a 295nm. Neste caso os valores de absorvância encontram-se mais elevados quando temos a presença de G-quadruplex sendo posteriormente reduzidos após a desnaturação por calor. Assim, é também possível estudar a temperatura de *melting* do quadruplex na presença de ligandos por CD. Se um ligando estabilizar uma estrutura deverá aumentar a temperatura de *melting* do DNA em estudo (figura 4)<sup>(7)</sup>.



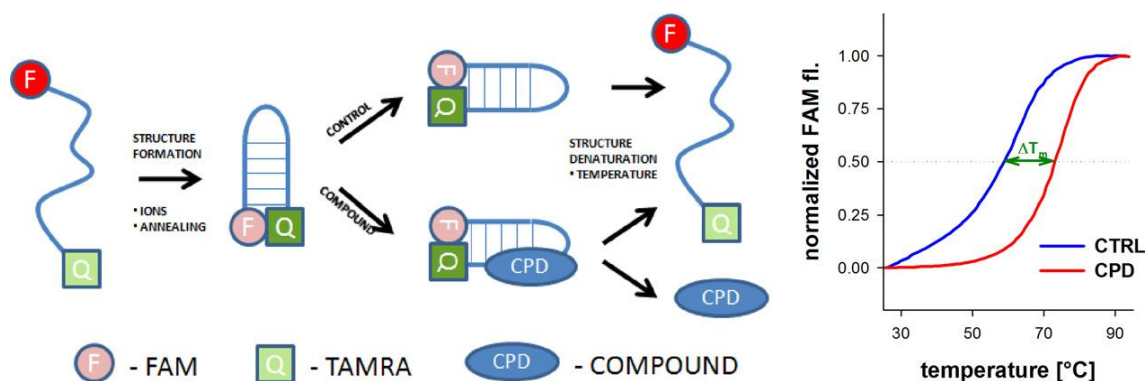
**Figura 4** - Representação esquemática da avaliação da temperatura de *melting* usando CD. A temperatura de *melting* ( $T_{1/2}$ ) aumenta quando o G-quadruplex é estabilizado por um ligando. (Imagem adaptada de Murat, P., Y. Singh, and E. Defrancq, *Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions*. Chem Soc Rev, 2011. 40(11): p. 5293-307.

### 1.2.3 - FRET-melting

Uma técnica molecular de fluorescência para o estudo de interações de ligandos com o G-quadruplex é o FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Neste método, é necessária a adição de dois fluoróforos (doador e recetor) às extremidades 5' e 3' do oligonucleótido

selecionado para o estudo. No caso de estudos de ligandos do G-quadruplex é necessário a escolha de um oligómero com fragmentos de guaninas que permitam a formação de G-quadruplex. Habitualmente o fluoróforo utilizado como doador é a 6-carboxifluoresceína (FAM) e o usado como recetor a carboxitetrametilrodamina (TAMRA)<sup>(12)</sup>.

Uma vez excitado, o fluoróforo doador transfere a sua energia para o fluoróforo recetor. Porém, a eficiência da energia transferida depende da distância entre as sondas. Como tal, alterações da estrutura do oligonucleótido (como por exemplo a sua desnaturação) vão alterar a distância entre os fluoróforos, modificando conseqüentemente a eficiência da energia transferida<sup>(13)</sup>. As curvas de *melting* do oligonucleótido em estudo são então determinadas na presença e na ausência de uma concentração de ligando com recurso à deteção da alteração da fluorescência por um equipamento de real-time PCR<sup>(14)</sup>.



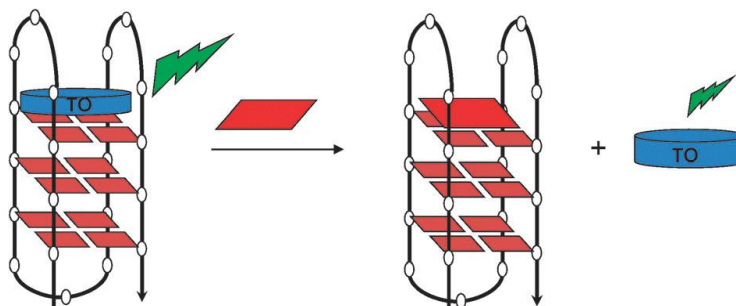
**Figura 5** - Representação esquemática do procedimento experimental para determinação da temperatura de *melting*/ efeito estabilizador de ligandos (Imagem adaptada de Renciuik, D., et al., *A FRET-based screening assay for nucleic acid ligands*. 2012. 57 (1): p. 122-8)

#### 1.2.4 - G4-FID

Os ácidos nucleicos têm capacidade de reconhecer e interagir com diferentes proteínas ou moléculas controlando desta forma inúmeros processos celulares como por exemplo a regulação génica. Várias técnicas são usadas para o estudo desta interação contudo estas são normalmente demoradas e trabalhosas. Por outro lado, o FID (*fluorescente intercalator displacement*) é um método não destrutivo, tecnicamente simples que permite realizar *screenings*. Este ensaio recorre a um fluoróforo com capacidade de intercalar com o DNA sendo os mais comumente usados o iodeto de propídeo ou laranja de Tiazol. Durante o procedimento, o DNA é incubado com este fluoróforo que, após ligação, emite uma determinada fluorescência. A adição de um ligando com capacidade de interagir com o DNA vai gerar uma espécie de competição, originando um deslocamento do fluoróforo que se traduz numa diminuição da fluorescência<sup>(15)</sup>.



Posteriormente, foi possível verificar que o laranja de tiazol demonstra elevada afinidade para oligonucleotídeos que formam G-quadruplex e assim, esta técnica foi adaptada para o estudo de interações com ligandos. A capacidade de deslocamento de um determinado ligando pode ser facilmente monitorizada pela diminuição da fluorescência do laranja de tiazol (excitação - 501nm; emissão - 539nm) de uma maneira simples e rápida<sup>(16)</sup>.



**Figura 6** - Representação esquemática do método G4-FID. Este método baseia-se na diminuição da fluorescência pelo deslocamento do laranja de tiazol do complexo tiazol-DNA. (Imagem adaptada de Murat, P., Y. Singh, and E. DeFrancq, *Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions*. Chem Soc Rev, 2011. 40(11): p. 5293-307.

### 1.3 - Importância do G-Quadruplex no genoma Humano

Como referido anteriormente, o interesse por sequências de G-quadruplex surge devido às suas características conformacionais únicas, e à presença de sequências G4 em regiões biologicamente funcionais do genoma. Estudos bioinformáticos previram e demonstraram que no genoma humano estão presentes inúmeras sequências capazes de formar espontaneamente estruturas do G-quadruplex<sup>(17)</sup>. Para além deste facto estudos *in vivo* conseguiram identificar e localizar estas sequências de G4 em locais específicos do genoma. Assim, foi descrita a presença de G-quadruplex em promotores de oncogenes (como por exemplo KIT e MYC), telómeros, zonas de início de transcrição (TSSs)<sup>(18)</sup>.

Assim sendo, a presença destas estruturas em locais tão específicos, confirma que estas desempenham um papel crucial no controlo de uma variedade de processos celulares como por exemplo a manutenção dos telómeros, replicação, transcrição e tradução.

#### 1.3.1 - G-quadruplex: Telómeros e Telomerase

Os telómeros são estruturas de DNA associadas a proteínas presentes nos terminais dos cromossomas das células eucariotas. Este complexo DNA-proteínas constitui uma estrutura em forma de cápsula (“*capping*”) no terminal dos cromossomas que desempenha funções de proteção, manutenção da estabilidade genómica e silenciamento de genes. Contudo, quando

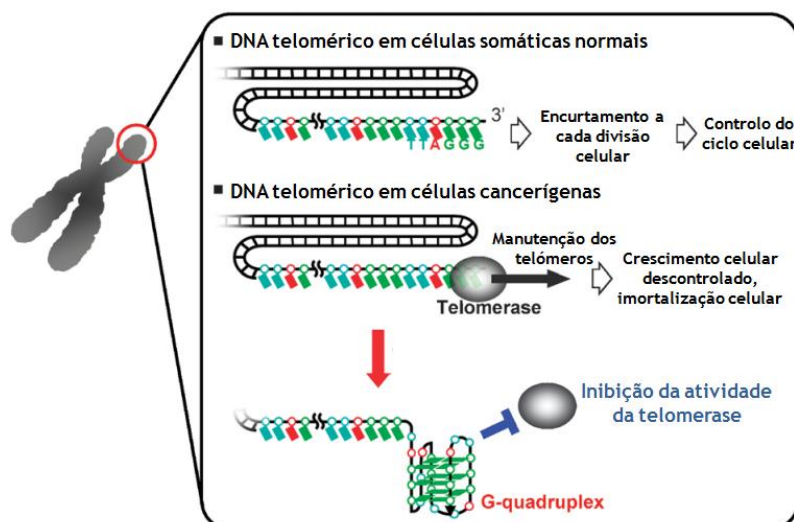
esta estrutura é perdida (“*uncapping*”), ocorre a disfunção dos telómeros, originando alterações genéticas que podem culminar no aparecimento de tumores<sup>(19, 20)</sup>.

O DNA telomérico humano é constituído por sequências repetitivas de 5'-TTAGGG-3' predominantemente em cadeia dupla associadas a um terminal de cadeia simples constituída por cerca de 100-200 guaninas<sup>(21)</sup>. Segundo a literatura, a cadeia terminal 3' poderá formar uma das várias topologias de G-quadruplex ou formar um “*t-loop*” - estrutura em forma de laço na qual a cadeia 3' invade a região de dupla cadeia do DNA telomérico. Os estudos disponíveis referem que estas duas estruturas poderão coexistir nos telómeros sendo que a formação de G-quadruplex se demonstra ser a mais plausível em células humanas<sup>(21)</sup>.

A formação de G-quadruplex nos telómeros têm sido alvo de estudo e vários modelos têm sido sugeridos. Ensaio com sequências semelhantes às dos telómeros - d(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>) e d(T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) - demonstraram formar G-quadruplex com topologia paralela na presença de K<sup>+</sup><sup>(22)</sup>. Estudos posteriores de RMN revelaram que este tipo de sequências poderá gerar híbridos onde a topologia paralela e antiparalela coexistem<sup>(23)</sup>.

Nos telómeros, em condições normais, estão presentes nucleases e pequenos segmentos de DNA que não podem ser copiados. Durante o ciclo de vida da célula, esses fragmentos serão perdidos durante a replicação do DNA resultando num encurtamento progressivo do tamanho dos telómeros até atingirem um ponto crítico (limite de Hayflick) no qual as células interrompem a sua proliferação, entram em senescência e morrem - “envelhecimento celular”<sup>(21)</sup>.

Todavia, a maioria dos tumores humanos, utiliza a manutenção dos telómeros como mecanismo para compensar o encurtamento gradual que acompanha a proliferação celular e assim conseguir uma capacidade replicativa ilimitada. Estas células conseguem manter o tamanho dos telómeros tornando-se assim imortais. Este é então o ponto crítico para o desenvolvimento e progressão de um tumor<sup>(20)</sup>.



**Figura 7** - Significância biológica do DNA telomérico e telomerase: diferença entre células normais e células cancerígenas. A presença de G-quadruplex consegue inibir a atividade da telomerase. Na figura está representado o DNA telomérico e o G-quadruplex. As bases timina, adenina e guanina estão representadas a azul, vermelho e verde respectivamente. (Imagem adaptada de Yaku, H., et al., *Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications*. Chem Commun (Camb), 2012. 48(50): p. 6203-16.)

A telomerase é uma ribonucleoproteína transcriptase reversa e a sua atividade pode ser reconstituída *in vitro* por dois componentes essenciais: uma subunidade RNA hTERC (que funciona como molde para a adição de novas repetições teloméricas), e uma componente catalítico hTERT. *In vivo* estas subunidades estão associados a outros fatores adicionais que afetam a localização e atividade da enzima<sup>(24)</sup>. Esta enzima é capaz de compensar a perda progressiva dos telômeros através da adição de seqüências TTAGGG ao terminal 3' do terminal cromossômico. Contudo, apesar da atividade desta enzima ser variável consoante o tipo de célula, a sua presença em tecidos adultos normais é mínima e insuficiente para prevenir o encurtamento associado ao envelhecimento celular<sup>(19, 20)</sup>.

A atividade da telomerase pode ser detetada em células cancerígenas com elevada frequência em vários tipos de tumores humanos. Nestas células, os telômeros são mais curtos que os normais, mas são estáveis demonstrando que houve um encurtamento progressivo até certo ponto onde o mecanismo de manutenção foi iniciado<sup>(24, 25)</sup>.

Posto isto, várias pesquisas tem descrito a inibição da atividade da telomerase como um método de inibição da formação de tumores. Como tal, é de salientar a estabilização do G-quadruplex formado nos terminais dos telômeros (Figura 7). Ao estabilizar esta estrutura é possível impedir que o telômero fique disponível para a extensão pela telomerase ou pelo aumento alternativo dos telômeros (ALT). Para além disso, ainda pode impedir o desenrolamento da cadeia pela atuação da helicase. Por outro lado, a disrupção do G-

quadruplex pode permitir a disponibilidade dos telómeros para inúmeros processos como por exemplo a sua ampliação<sup>(26)</sup>.

Com base no que foi descrito anteriormente, a estabilização de G-quadruplex nos telómeros por ligandos, tem vindo a ser cada vez mais investigada uma vez que estes poderão tornar-se potenciais fármacos para tratamento de tumores<sup>(21)</sup>.

### 1.3.2 - G-quadruplex na regulação da transcrição: promotores de oncogenes

Como já foi descrito anteriormente, as sequências de G-quadruplex também se encontram nos promotores de genes e locais de início de transcrição (*transcription start sites* - TSSs). Estudos revelam que estas zonas têm cerca de 230x mais sequências possíveis de formar G-quadruplex comparando com o restante DNA<sup>(27)</sup>.

Em contraste com as sequências teloméricas, as presentes nos promotores de genes propícias a formar G-quadruplex são mais diversificadas apresentando diferentes quantidades de guaninas e comprimentos variados. Neste caso, estas sequências tenderão a dobrar-se sobre si próprias e a formar G-quadruplex intramoleculares paralelos. Contudo algumas referências afirmam que outras conformações também são possíveis<sup>(28, 29)</sup>.

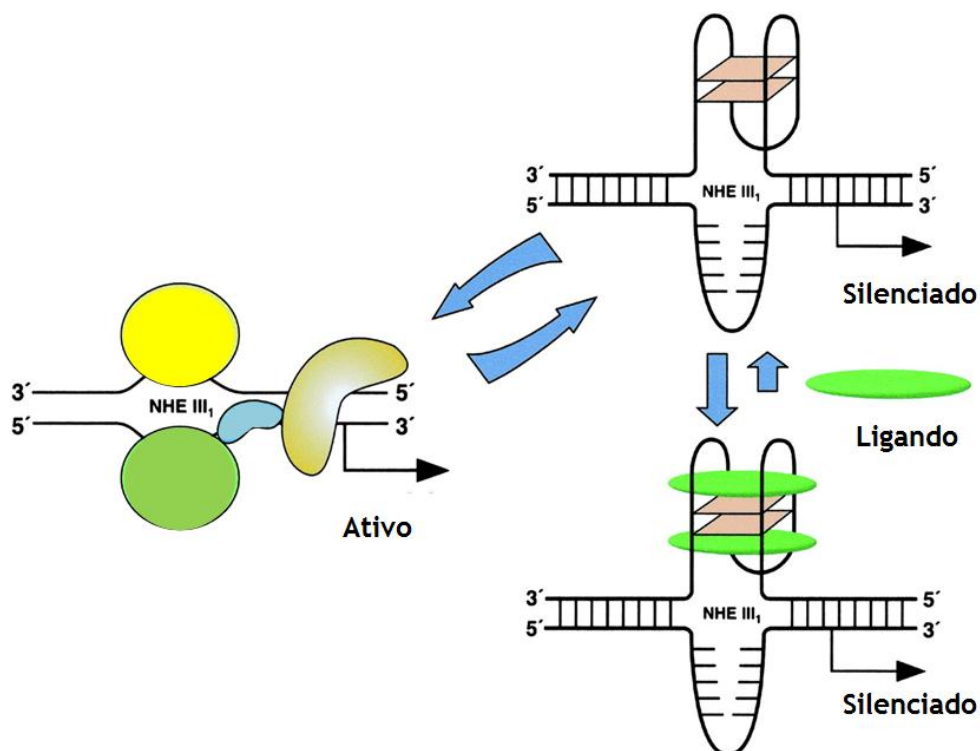
Até à data, algumas estruturas de G-quadruplex em promotores foram descritas recorrendo a estudos de RMN, cristalografia e dicroísmo circular. Usando estas técnicas foram propostos diferentes padrões de formação de G-quadruplex em diferentes promotores incluindo: *MYC*, *KIT*, *BCL-2*, *VEGF*, *HIF1a*, *MYB*, *PDGFA*, *PDGFRB*, *KRAS*, *RB1* e *TERT*<sup>(29)</sup>. Seguidamente serão discutidos em pormenor os G-quadruplex nos promotores *MYC* e *KIT* uma vez que estão caracterizados na literatura.

#### 1.3.2.1 - *c-MYC*

Um dos promotores mais estudados no âmbito da formação de G-quadruplex é o da oncoproteína *c-MYC* que tem uma função importante na proliferação celular e/ou na indução de apoptose. A desregulação do fator de transcrição *c-MYC* é quase sempre uma consequência de amplificação génica, translocações cromossómicas, polimorfismos em regiões regulatórias, alteração de ploidia ou aumento de transcrição devido a anomalias de sinalização. Uma grande percentagem de tumores sólidos apresenta uma elevada expressão de *MYC*: gastrointestinal, ovário, mama e como tal este foi definido como um alvo terapêutico<sup>(30)</sup>.

Cerca de 80-90% da expressão de *c-MYC* é controlada pelo elemento de hipersensibilidade nucleasa III1 (NHE III1) que contém uma sequência de 27 pares de bases (Pu27) rica em guaninas (5'-TG<sub>4</sub>AG<sub>3</sub>TG<sub>4</sub>AG<sub>3</sub>TG<sub>4</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>-3'). Esta sequência, localizada a -142 a -115 pb *upstream*

do promotor P1, pode formar diferentes topologias de G-quadruplex<sup>(31, 32)</sup>. A transição entre a forma de DNA duplex e G-quadruplex nesta zona do promotor possibilita a mudança para a forma transcritoral ativa ou silenciada. Assim sendo, quando a sequência rica em guaninas se encontra na forma de dupla hélice, as RNA polimerases (em conjunto com vários outros fatores de transcrição) conseguem transcrever o gene *c-Myc*. Por outro lado, quando esta zona se encontra em G-quadruplex, o gene adquire a forma silenciada uma vez que a formação desta estrutura impede a interação dos fatores de transcrição (Figura 8) <sup>(33)</sup>.



**Figura 8** - Modelo representativo da ativação ou silenciamento da transcrição gênica. Interação entre a estrutura G-quadruplex e um ligando. O ligando estabiliza a estrutura da forma silenciada do gene pela inibição da conversão na forma ativa. (Imagem adaptada de Siddiqui-Jain, A., et al., *Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11593-8.)

Estudos realizados com ligandos (TMPyP4 - porfirina) demonstraram que o G-quadruplex no promotor de *c-MYC* pode ser estabilizado e conseqüentemente silenciado (inibição da sua expressão). Tal facto sugere que a presença desta conformação no promotor funciona como um elemento regulador aumentando ou diminuindo a expressão do *MYC*<sup>(34)</sup>.

Deste modo, uma vez que as sequências de G-quadruplex têm um papel importante na repressão do *c-MYC*, ligandos que consigam induzir ou estabilizar a formação de G-quadruplex *in vivo* podem ser considerados potenciais fármacos anticancerígenos.

### 1.3.2.2 - *c-KIT*

O proto-oncogene *KIT* codifica um recetor de tirosina-cinase que é especificamente expresso nos mastócitos, melanócitos e células-tronco hematopoéticas. Este recetor, quando ativado pelo seu ligando promove a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular<sup>(35)</sup>.

Mutações associadas a ganho de função deste gene estão presentes numa vasta gama de doenças neoplásicas sendo as mais frequentes os mastocitomas e os tumores gastrointestinais<sup>(36)</sup>.

Estudos realizados abordando este gene permitiram desde já descrever duas sequências capazes de formar G-quadruplex na sua região promotora. A primeira região, localizada entre -87 e -109 pb, denominada *c-Kit22*, apresenta uma estrutura de G-quadruplex com topologia tipicamente paralela. Por outro lado, a sequência localizada entre -140 e -160 pb, denominada *c-Kit21*, apresenta uma conformação híbrida em que a topologia predominante é paralela podendo também apresentar estruturas antiparalelas<sup>(37, 38)</sup>. Para além disso, referências identificam a sequência deste promotor como um alvo terapêutico uma vez que possui características estruturais únicas<sup>(39)</sup>.

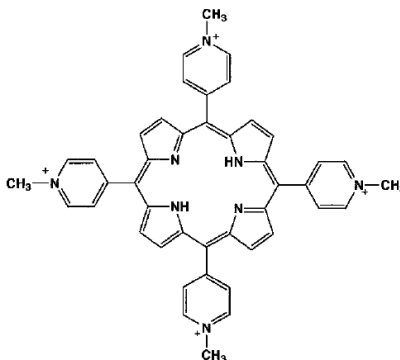
## 1.4 - Ligandos do G-quadruplex

A investigação da regulação genética através do G-quadruplex tem levado ao desenvolvimento de uma série de compostos que interagem e/ou estabilizam o G-quadruplex e que podem atuar como potenciais agentes quimioterapêuticos. A topologia das estruturas do G-quadruplex permite o reconhecimento de alguns ligandos. Vários compostos como por exemplo a porfirina (TMPyP<sub>4</sub>), telomestatina ou a quarfloxina (CX-3543) são estabilizadores do G-quadruplex.<sup>(40, 41)</sup>

### 1.4.1 - Porphirina - TMPyP<sub>4</sub>

A porfirina ou 5,10,15,20-tetra-(N-metil-4-piridilo) é um composto capaz de interagir e estabiliza o G-quadruplex nos telómeros comportando-se como um inibidor da telomerase. Estudos prévios realizados em células cancerígenas da mama (MCF7) mostraram que baixas concentrações de TMPyP<sub>4</sub> (1µM e 10µM) conseguiram reduzir a atividade da telomerase em cerca de 50%. Para além do observado, estas concentrações não são tóxicas para as células uma vez que os valores de EC<sub>50</sub> detetados são superiores as valores necessários para inibição da telomerase (49,6µM)<sup>(42)</sup>. Células leucémicas demonstraram ter o mesmo comportamento

sendo que concentrações de 20 $\mu$ M a 100 $\mu$ M diminuíram a atividade da telomerase e inibiram o crescimento celular através da normalização de inúmeros genes envolvidos na regulação do ciclo celular, adesão celular, sinalização celular e oncogenes<sup>(43)</sup>. Estudos posteriores, demonstraram que este composto também consegue diminuir a expressão e a atividade do gene *c-MYC* assim como tem a capacidade de se ligar ao promotor do gene *BCL-2*<sup>(44, 45)</sup>.

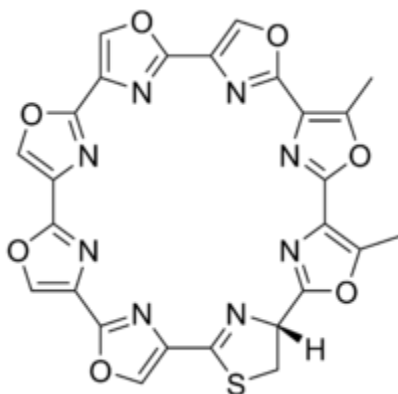


**Figura 9** - Estrutura da 5,10,15,20-tetra-(*N*-metil-4-piridilo)porfirina (TMPyP<sub>4</sub>). (Imagem adaptada de Grand, C.L., et al., *The cationic porphyrin TMPyP<sub>4</sub> down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo*. Mol Cancer Ther, 2002.

Mais recentemente, a sua atividade anti tumoral foi testada em células cancerígenas do ovário recorrendo à terapia foto dinâmica sendo que, após tratamento com o composto, foi denotada uma diminuição do crescimento celular. Para além disto, foi demonstrado que também poderia atuar a nível da diminuição da expressão de *MCM2* (gene associado à replicação celular) e *CA-IX* (proteína transmembranar associada a tumores)<sup>(46)</sup>.

#### 1.4.2 -Telomestatina

A telomestatina foi isolada de um produto natural gerado por *Streptomyces anulatus* 3533-SV4. É um composto mais específico e um potente inibidor da telomerase<sup>(47)</sup>. A telomestatina promove a formação ou estabilização do G-quadruplex sendo mais seletiva para estruturas intramoleculares do que a TMPyP<sub>4</sub><sup>(48)</sup>.



**Figura 10** - Estrutura da telomestatina. (Imagem adaptada de Kim, M.Y., et al., Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J Am Chem Soc*, 2002).

Pesquisas realizadas com várias linhas celulares de neuroblastoma demonstraram que a exposição a  $5\mu\text{M}$  de telomestatina seria suficiente para reduzir a atividade da telomerase em cerca de 60%. Associado a este facto a exposição prolongada a este composto permitiu a observação da indução da morte celular por apoptose<sup>(49)</sup>.

Estudos realizados com a telomestatina em linhas celulares de mieloma múltiplo corroboraram os dados anteriormente citados sendo que para estes tipos celulares  $1\mu\text{M}$  foi suficiente para inibir cerca de 90% a atividade da telomerase. Apesar de terem sido realizados ensaios de avaliação de expressão génica, não se verificaram alterações significativas sugerindo que a apoptose observada se deverá predominantemente à função da telomerase e consequente encurtamento dos telómeros<sup>(50)</sup>.

Em células leucémicas, o tratamento com  $2\mu\text{M}$  provocou a inibição da enzima telomerase (cerca de 50%) e do mRNA da hTERT de uma forma dependente da dose. As células cancerígenas tratadas com este composto demonstram encurtamento dos telómeros e consequente disfunção dos mesmos. A perda de viabilidade das células foi acompanhada da ativação de vias de reparação de lesões no DNA assim como de proteínas responsáveis por interrupção do ciclo celular. Associado a este facto, foi verificado que este efeito da telomestatina era muito inferior em células sanguíneas saudáveis sugerindo assim seletividade para células cancerígenas<sup>(51)</sup>.

#### 1.4.3 - Quarfloxina (CX-3543)

A quarfloxina afeta indiretamente a transcrição do MYC através de um sistema regulatório envolvendo a nucleolina. Mais especificamente, o composto concentra-se nos nucléolos onde se liga e estabiliza o G-quadruplex presente no DNA ribossomal resultando na disrupção dos complexos nucleolina-G4. Este evento causa a redistribuição da nucleolina. Esta pode eventualmente ligar-se à NHE III1, facilitando a formação e estabilização do G-quadruplex do



MYC e assim, resultando na prevenção da transcrição gênica e indução da apoptose<sup>(41)</sup>. Outros estudos referem que, para além disso, a CX-3543 tem como alvo a biogénese de rRNA induzindo seletivamente a apoptose em células cancerígenas<sup>(52)</sup>.

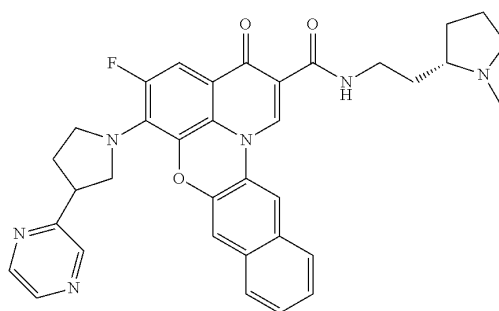


Figura 11 - Estrutura da quarfloxina CX-3543. (Imagem adaptada Drygin, D., et al., *Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis*. Cancer Res, 2009.

## 1.5 - Esteróides, ácidos biliares e derivados

Os esteroides (Figura 12) são um grupo variado de compostos relacionados estruturalmente que possuem propriedades farmacodinâmicas notáveis e que desempenham funções importantes a diversos níveis. Deste grande grupo fazem parte: hormonas adrenal-corticais, hormonas sexuais, glicosídeos cardíacos, vitaminas anti raquíticas (Vitamina D), venenos de animais, saponinas, ácidos biliares e alguns alcaloides<sup>(53)</sup>.

As hormonas esteroides e derivados representam uma das classes mais usadas como agente terapêutico nomeadamente: controlo da natalidade, condições inflamatórias, terapia de substituição de hormonas e no tratamento de doenças neoplásicas<sup>(54)</sup>.

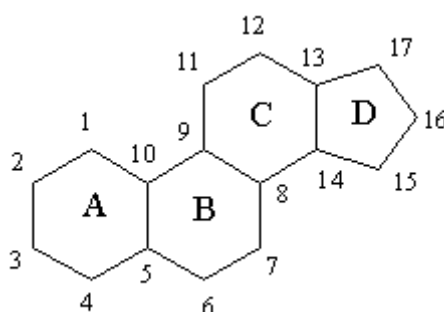


Figura 12 - Estrutura base das moléculas de esteroides.

Os ácidos biliares são compostos que desempenham papéis a nível dos sistemas biológicos. Compostos desta família têm vindo a ser investigados não só para o *design* de fármacos anti microbiais como também de anti tumorais<sup>(55)</sup>.

A mesma família de compostos não implica a mesma atividade biológica. No caso dos ácidos biliares tal facto foi comprovado por estudos realizados em simultâneo com os seus derivados: ácido cólico, chenodesoxicólico, ácido deoxicólico e ursodesoxicólico. Estes compostos foram estudados em linhas celulares provenientes de diferentes tecidos (adenocarcinoma - HTC116, HT29; queratinócitos - HaCat; tumor da mama - T47D e carcinoma cervical- HeLa) e mostraram poder citotóxico. Foi possível diferenciar o mecanismo envolvido sendo que o ácido desoxicólico e o ácido chenodesoxicólico não inibem o crescimento celular mas induzem a morte celular por apoptose. Por outro lado, o ácido ursodesoxicólico inibe a proliferação celular através do bloqueio das células na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular<sup>(56)</sup>.

Alguns estudos têm sido realizados no âmbito dos derivados dos ácidos biliares para indução da apoptose em células cancerígenas. Pesquisas realizadas em células humanas de cancro cervical possibilitaram o estudo e avaliação biológica de derivados de ácidos biliares sintetizados quimicamente. Após a incubação com estes compostos pode ser observada uma indução da apoptose através da ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF-κB (reguladores do ciclo celular)<sup>(57)</sup>.

### 1.5.1 - Esteroides e G-quadruplex

Baseados nas capacidades dos esteroides, têm sido sintetizados compostos com o intuito de desenvolver novos fármacos com novos alvos terapêuticos.

Até ao momento, foram realizados ensaios com esteroides derivados de plantas devido à sua semelhança estrutural com as hormonas esteroides. Tal facto poderá sugerir que estes compostos estão aptos a interagir com o DNA. Estudos de derivados de esteroides-diamina mostraram que este tipo de compostos interage com o G-quadruplex, nomeadamente, com as sequências teloméricas inibindo a elongação dos telómeros. Os esteroides malouetina clorada e funtumina guanilhidrazona (FG) são capazes de estabilizar sequências teloméricas humanas. Para além disto, o FG revelou um poder inibitório elevado (IC<sub>50</sub> = 1,8 μM - 5 μM) em células do carcinoma do pulmão (HT1080, H460), carcinoma cervical (HeLa) e fibroblastos imortalizado (BJhTERT). Este composto revelou ser um potente ligando do G-quadruplex capaz de impedir a elongação dos telómeros. Em suma, o estudo destes compostos aliados aos conhecimentos químicos para a modificação de moléculas permitirá melhorar não só a sua seletividade como a sua capacidade anti proliferativa<sup>(58)</sup>.

Estudos mostraram a conjugação do ácido cólico com um aminoácido e através de estudos de dicroísmo circular verificaram que este era capaz de induzir a formação de G-quadruplex paralelo na região promotora do oncogene c-MYC. Estudos a nível celular utilizando células do cancro da mama (MCF-7) mostraram que 1 μM deste composto inibia a transcrição do oncogene c-MYC em cerca de 21%<sup>(55)</sup>.

### 1.5.2 - Síntese de compostos derivados do ácido litocólico

Atualmente, o cancro é uma patologia prevalente na sociedade e, como tal, é cada vez mais importante o desenvolvimento de novas e melhores terapias. Neste contexto, foram sintetizados vários compostos derivados de ácido litocólico.

Para a realização deste trabalho experimental, do grande grupo dos esteroides, foi selecionado o ácido litocólico. A partir deste, foram sintetizados vários compostos macrociclos com vista a interação com o G-quadruplex (Figura 13).

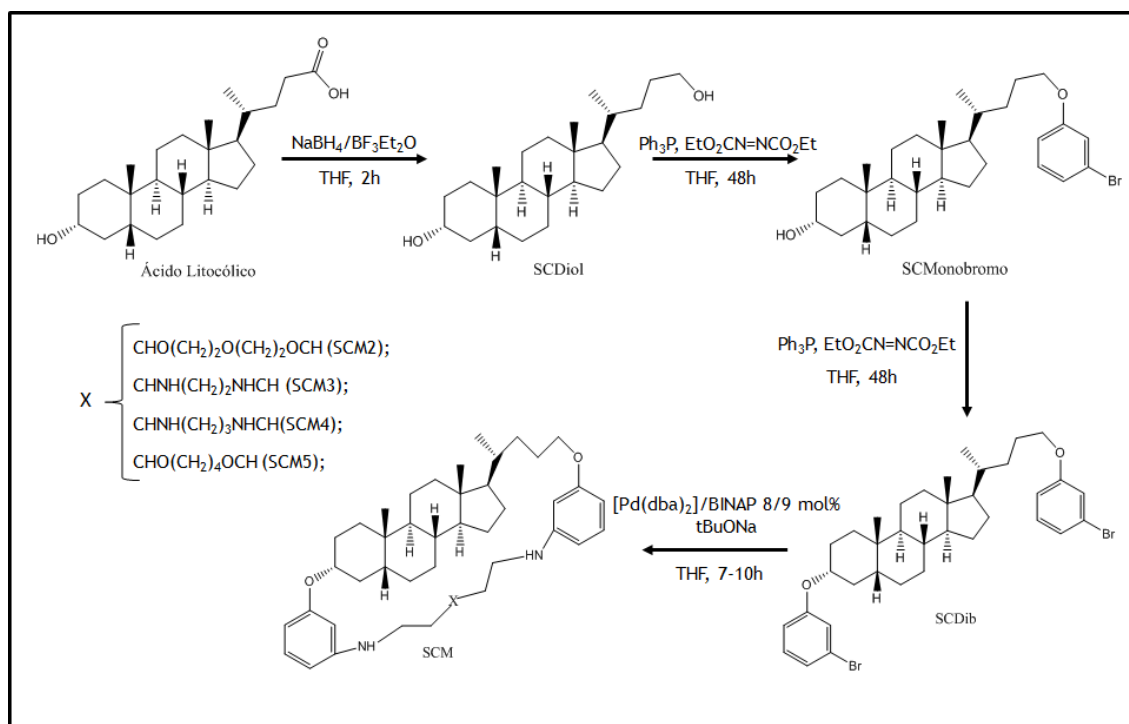


Figura 13 - Esquema geral das reações de síntese dos derivados de ácido litocólico

Os compostos foram sintetizados primeiramente pela redução do ácido litocólico a um álcool primário o qual foi convertido num haleto de arilo através da reação de Mitsunobu. Por último este composto intermediário sofreu substituições nucleofílicas com diferentes aminas.

Após a síntese destas moléculas, a avaliação da potencial interação com o DNA, mais especificamente com a conformação de G-quadruplex, poderá facilitar o desenvolvimento de novas terapias a nível oncológico com ação no G-quadruplex. Por complemento a estes ensaios de interação, os estudos de citotoxicidade permitiram a compreensão do seu potencial anticancerígeno e/ou antiproliferativo.



## Capítulo 2 - Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- Sintetizar e caracterizar novos ligandos derivados do ácido litocólico através de reações de adição de anéis aromáticos e aminação. Purificação por cromatografia, e caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.
- Estudar a interação e a afinidade entre os ligandos sintetizados e estruturas do G-quadruplex: Estudos por dicroísmo circular.
- Avaliar a ação anti proliferativa dos compostos sintetizados em células humanas cancerígenas (mama, próstata e glioma) e humanas não cancerígenas.
- Verificar a internalização dos compostos pelas células e determinar a sua localização celular.
- Determinar o tipo de morte celular promovidos pelos compostos: necrose ou apoptose.



## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

### 3.1 - Síntese Química

#### 3.1.1 - Reagentes e solventes

Os compostos comercialmente adquiridos foram utilizados nas reações de síntese sem qualquer purificação. O ácido litocólico, NaBH<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O, DEAD em 40% de tolueno, bromofenol, trifetilfosfina foram adquiridos à Acros.

Os solventes utilizados: diclorometano, éter dietílico, clorofórmio, dioxano, tetrahidrofurano e tetrahidrofurano anidro foram adquiridos à Fisher Chemical enquanto que o dioxano anidro foi adquirido à Sigma Aldrich e a acetona pura à Chem Lab.

O solvente deuterado utilizados para a obtenção dos espectros foi o clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) igualmente adquirido à Sigma Aldrich.

#### 3.1.2 - Equipamentos

As reações foram realizadas em placas de aquecimento e de agitação magnética da marca Heidolph e a evaporação de solventes orgânicos foi realizada em evaporadores rotativos da marca Büchi.

Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros Bruker Avance III 400 MHz e 600 MHz e o solvente usado para a obtenção dos espectros foi clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) e como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

A caracterização dos compostos foi realizada por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e bidimensionais.

#### 3.1.3 - Procedimentos cromatográficos

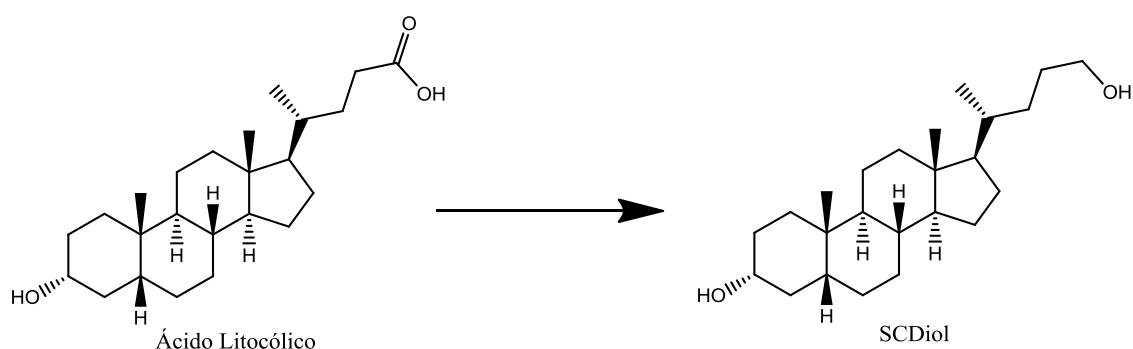
O curso das reações foi acompanhado por cromatografia de camada fina (*Thin Layer Chromatography* - TLC). Para tal foram utilizadas placas de sílica gel comerciais ALUGRAM® Xtra SIL G da Macherey-Nagel. A eluição foi realizada com uma mistura de diferentes solventes orgânicos que se encontra indicados na proporção v/v. Algumas das

placas foram observadas sob luz ultravioleta (254nm) antes de serem reveladas numa solução de etanol/ácido sulfúrico (95:5, v/v) seguido de um aquecimento a 120°C.

No isolamento e purificação dos compostos recorreu-se à cromatografia em coluna que foi realizada usando sílica-gel (0,060-0,200mm) adquirida à Acros. O eluente usado também se encontra indicado como proporção v/v ao longo da descrição do procedimento experimental.

### 3.1.4 - Procedimentos experimentais

#### 3.1.4.1 - Síntese de SCDiol



O ácido litocólico (2,8264g; 0,0075mol) e o NaBH<sub>4</sub> (2,118g; 0,056mol) foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF) anidro (75mL) num balão de três tubuladuras de 250mL. Seguidamente foi adicionado BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O (4,6mL; 0,0075mol) gota a gota. A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 2 horas sob agitação e atmosfera de árgon e foi seguida por TLC (CHCl<sub>2</sub>:Éter 1:2).

Quando a reação terminou, foi adicionada uma solução saturada de NaCl (50mL) gota a gota seguida da adição de 100mL de água. Foi então realizada uma extração com diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (250mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada no rotavapor. O produto sólido de cor branca obtido foi seco sob atmosfera de vácuo durante 12 horas.

Posteriormente, o produto foi recristalizado com acetona quente, filtrado e colocado a -20°C durante aproximadamente 12 horas. Os cristais obtidos foram filtrados e secos sob atmosfera de vácuo durante cerca de 12 horas.

A análise da TLC realizada após o *work-up* da reação revelou 1 produto (R<sub>f</sub> 0,57). Após a sua purificação o produto foi analisado por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN:

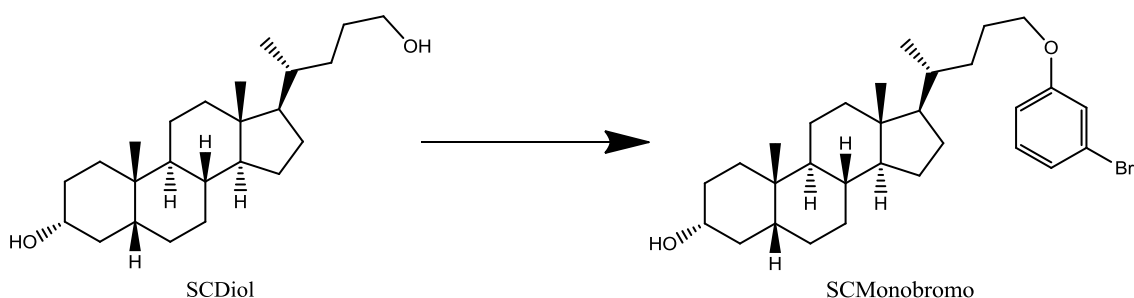


**Produto 1 - SCDiol:** (2,00g, rendimento 70,66%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,64 (s, 3H); 0,91 (s, 4H); 0,93 (s, 2H); 0,95-1,90 (m, 27H); 1,93-2,00 (m, 1H); 3,55-3,67 (m, 3H);

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12,04; 18,63; 20,83; 23,38; 24,22; 26,43; 27,20; 28,31; 29,42; 30,55; 31,82; 34,58; 35,34; 35,59; 35,85; 36,46; 40,19; 40,45; 42,10; 42,71; 56,18; 56,52; 63,62 e 71,90.

### 3.1.4.2 - Síntese de SCMonobromo:



Num balão de fundo redondo de 100mL dissolveu-se o SCDiol (1,008g; 2.73mol) em THF anidro (70mL). Seguidamente adicionou-se trifetilfosfina (1,43g; 5,46mol), bromofenol (0,936g; 5,46mmol) e DEAD em 40% de tolueno (2,5mL; 5,46mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 48 horas sob agitação e argon e foi seguida por TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Quando a reação terminou, o solvente foi evaporado no rotavapor seguindo-se a adição de éter dietílico. O óxido de trifetilfosfina foi de seguida filtrado e o solvente evaporado de novo no rotavapor. O óleo resultante foi seco sob atmosfera de vácuo durante cerca de 12 horas.

A análise da TLC realizada após o *work-up* da reação revelou uma mistura de reagentes e produtos ( $R_f$  0,87; 0,75; 0,39 e 0,33). Por esta razão foi realizada uma coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para separar os compostos presentes.

Após análise dos compostos por RMN foi identificado o SCMonobromo

Após a purificação o produto foi analisado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ :

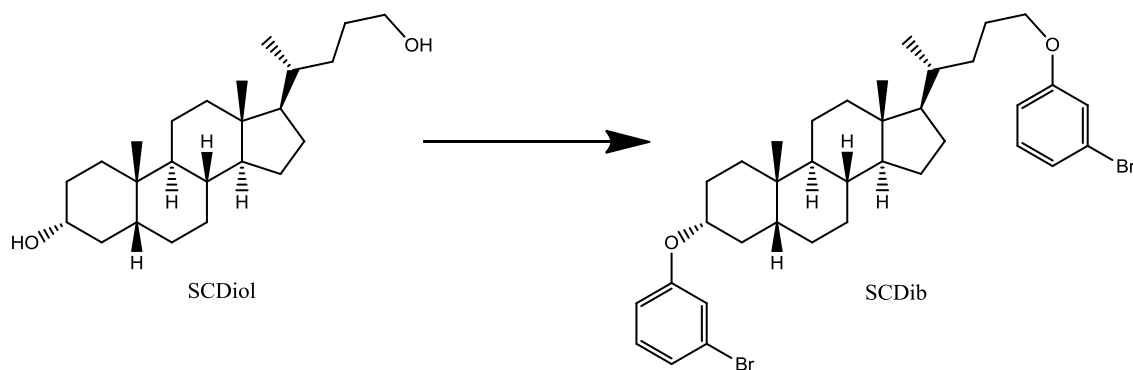
**Produto - SCSMonobromo:**

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,65 (s, 3H); 0,92 (s, 3H); 0,94 (d,  $J=6,73$  Hz, 3H); 0,98-1,90 (m, 26H); 1,97 (d,  $J=11,49$ ; 1H); 1,97 (d,  $J=11,58$ ; 1H); 3,62 (m, 1H); 3,89 (m, 2H); 6,81 (d,  $J=8,38$ Hz; 1 H); 7,05 (d,  $J=7,53$ ; 2H); 7,12 (t,  $J=15,9$ Hz; 1H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12,06; 18,60; 20,83; 23,38; 24,22; 25,77; 26,43; 27,20; 28,29; 30,56; 32,02; 34,57; 35,35; 35,52; 35,85; 36,46; 40,20; 40,44; 42,10; 42,71; 56,13; 56,51; 68,75; 71,87; 113,57; 117,73; 122,75; 123,51; 130,45 e 159,95.

Uma vez que o rendimento da reação foi residual a síntese deste composto não é rentável. Assim sendo, este composto não foi reproduzido nem testado a nível celular.

### 3.1.4.3 - Síntese de SCDib



Na síntese deste composto utilizamos o produto resultante da reação anterior (antes de realizar a coluna) a fim de evitar perda de composto e melhorar o rendimento. Assim, num balão de fundo redondo de 100mL dissolveu-se o composto obtido na síntese de SCSMonobromo em THF anidro (70mL). Seguidamente adicionou-se trifenilfosfina (1,43g; 5,46mmol), bromofenol (0,936g; 5,46mmol) e DEAD em 40% de tolueno (2,5mL; 5,46mmol). A reação ocorreu à temperatura ambiente durante mais 48 horas sob agitação e atmosfera de árgon e foi seguida por TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Quando a reação terminou, o solvente foi evaporado no rotavapor e seguiu-se a adição de éter dietílico. O óxido de trifenilfosfina foi de seguida filtrado e o solvente evaporado de novo no rotavapor. O óleo resultante foi seco sob atmosfera de vácuo durante cerca de 12 horas.

A análise da TLC revelou uma mistura de reagentes e produtos ( $R_f$  0,87; 0,75; 0,39 e 0,33). Por esta razão foi realizada uma coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para separar os compostos presentes.

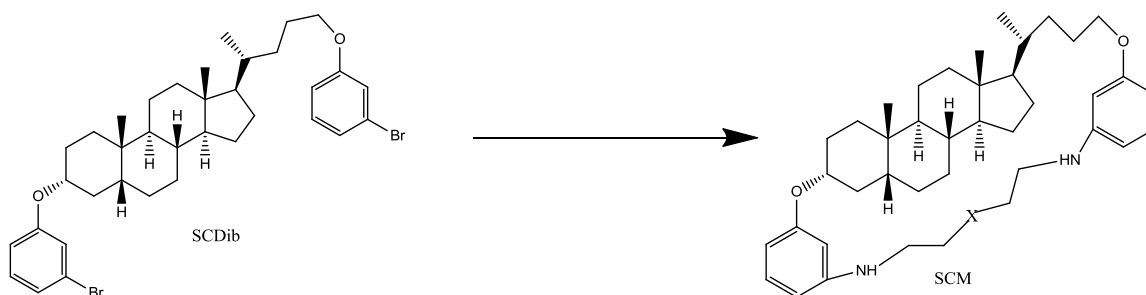
Após análise dos compostos por RMN foi identificado o SCDib.

**Produto - SCDib:** (0,886g, rendimento 88,41%)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,57 (s, 3H); 0,86 (d,  $J=6,41$  Hz; 3H); 0,88 (s, 3H); 0,95-1,94 (m, 28H); 3,73-3,83 (m, 2 H); 4,45 (s, 1H); 6,68-6,73 (m, 2H); 6,90-6,97 (m, 4H); 6,98 (t,  $J=4,19$  Hz; 1H), 7,01ppm (t,  $J=4,02$  Hz; 1H);

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 11,07; 17,60; 20,08; 22,81; 23,18; 23,47; 24,72; 25,21; 25,53; 27,26; 29,22; 29,31; 31,01; 33,80; 34,46; 34,61; 35,90; 38,99; 39,21; 41,71; 55,11; 55,58; 67,68; 72,03; 112,48; 113,71; 116,68; 118,23; 121,73; 122,75; 123,51; 129,4 (3C); 157,57 e 158,88.

#### 3.1.4.4 - Síntese de Macrociclos



X=  $\text{CHO}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}$  (SCM2);  $\text{CHNH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}$  (SCM3);  $\text{CHNH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}$ (SCM4);  $\text{CHO}(\text{CH}_2)_4\text{OCH}$  (SCM5);

Na síntese dos macrociclos foi realizado o mesmo procedimento experimental sendo apenas alteradas as aminas utilizadas para a ciclização destes compostos.

Um balão de fundo redondo de 100mL de duas tubuladuras equipado com um condensador foi colocado sob atmosfera inerte. Dissolveu-se  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  (0,0206g; 8 mol %) e BINAP (0,0258g; 9 mol %) em 10mL de dioxano e adicionou-se ao balão com agitador. Dissolveu-se o SCDib (0,306g; 0,446mmol) em 15mL de dioxano e adicionou-se ao balão e deixou-se reagir durante 15 minutos. Por último adicionou-se o  $\text{tBuONa}$  (0,172g; 0,446 mmol) e a amina (0,892mmol) dissolvidos em dioxano. A reação ocorreu em refluxo durante 7-10 horas sob agitação e em atmosfera de argônio e foi seguida por TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ).

Quando a reação terminou, filtrou-se e o solvente foi evaporado no rotavapor. O óleo resultante foi seco na estufa de vácuo durante 12 horas.

A análise da TLC realizada após o *work-up* da reação revelou uma mistura de reagentes e produtos. Por esta razão foi realizada uma coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) para separar os compostos presentes.

Após a purificação os produtos foram analisados por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN:

**Produto - SCM2** (0,059g, rendimento 17,9%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 0,55 (s, 3H); 0,84 (d, J=6,41 Hz; 3H); 0,86 (s, 3H); 0,98-1,90 (m, 28H), 1,97 (d, J=11,49, 1H), 1,79 (br s, 6H) 2,70-2,83 (m, 8H), 3,12 (br s, 4H), 3,89 (br s, 2H), 4,53 (s, 1H), 6,10-6,26 (m, 6H); 7,05 (t, J=7,53 1H), 7,12 (t, J=8,19Hz, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: 11,08; 17,67; 20,10; 22,88; 23,26; 23,74; 24,49; 25,01; 25,32; 25,63; 27,31; 29,50; 31,12 (2C); 33,86; 34,55; 34,72; 35,99; 39,04; 39,28; 40,69; 41,79 (2C); 55,27; 55,68; 67,28; 68,72; 69,27 (2C); 69,62 (2C); 71,30 (2C); 98,27; 100,02; 101,80; 103,24; 104,68; 104,92; 128,36; 128,84; 148,89; 148,94; 158,00 e 159,40.

**Produto - SCM3**(0,052g, rendimento 16,86%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 0,65 (s, 3H); 0,92 (d, J=5,6 Hz, 3H); 0,94 (s, 3H), 0,98-1,90 (m, 28H); 1,77 (q, J=6,2, 4H); 2,71 (s, 4H); 2,72 (t, J=6,3, 4H); 3,15 (t, J=5,2 Hz, 4H); 3,89 (br, s 2H); 4,54 (br s, 1H); 6,09-6,28 (m, 6H); 6,97-7,06 (m, 2H);

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: 11,08; 17,62; 20,09; 22,84; 23,20; 23,67; 24,96; 25,25; 25,59; 27,27; 28,43 (2C); 28,66 (2C); 31,09; 33,83; 34,52; 34,64; 35,93; 39,00; 39,24; 39,79; 41,72; 47,10 (2C); 48,41 (2C); 55,15; 55,62; 67,24; 71,23; 98,18; 99,86; 101,78; 103,32; 104,57; 104,79; 128,78; 128,87; 148,92; 148,95; 159,95 e 159,37.

**Produto - SCM4 não foi realizada purificação** (0,305g)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 0,54 (s, 3H); 0,83 (d, J=6,73 Hz, 3H); 0,86 (s, 3H); 0,93-1,95 (m, 28H); 1,79 (br s, 6H); 2,70-2,83 (m, 8H), 3,12 (br s, 4H); 3,85 (br s, 2H); 4,53 (s, 1H); 6,10-6,26(m 6H); 7,00 (t, J=8,38Hz, 1 H), 7,05 (t, J=7,53 1 H); 7,01 (t, J=15,9Hz, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: 11,08; 17,61; 20,09; 22,83; 23,20; 23,67; 24,88; 25,24; 25,59; 27,27; 29,46 (2C); 31,08; 33,84; 34,53; 34,65, 35,93; 39,01; 39,25; 41,73; 41,79; 46,86; 47,31; 47,55; 55,17; 55,63; 67,25; 71,24; 98,17; 99,85; 101,77; 103,33; 104,58; 104,81; 128,77 (2C); 148,95; 149,70; 157,96 e 159,37.

**Produto - SCM5** (0,043g, rendimento 21,89%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 0,65 (s, 3H); 0,94 (d, J=6,41 Hz; 3H); 0,86 (s, 3H); 0,98-1,90 (m, 28H); 1,97 (d, J=11,49, 1H); 1,79 (br s, 6H); 2,70-2,83 (m, 8H); 3,12 (br s, 4H); 3,89 (br s, 2H), 4,53 (s, 1H); 6,10-6,26 (m, 6H); 7,05 (t, J=7,53 1H); 7,12 (t, J=8,19Hz, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: 11,09; 17,63; 20,11; 22,85; 23,21, 23,69; 24,72; 24,97; 25,27; 25,62; 27,29; 29,48; 31,11 (2C); 33,85; 34,55; 34,68; 35,98; 39,02; 39,26; 40,96 (2C); 41,75; 55,17; 55,63; 67,23; 68,38; 69,71 (2C); 69,80 (2C); 71,52 (2C); 98,14; 99,81; 101,75; 103,31; 104,57; 104,79; 128,37; 128,80; 148,94; 148,98; 157,96 e 159,37.

## 3.2 - Técnicas de cultura celular

### 3.2.1- Linhas Celulares

Para a realização dos estudos celulares foram utilizadas quatro linhas celulares: linha celular de glioma humano (U-87), de cancro da mama (MCF-7), de cancro da próstata (LNCaP) e fibroblastos humanos da linha não cancerígena (NHDF).

As células U-87 são uma linha celular primária de células de glioblastoma formalmente conhecidas como U-87 MG (*malignant glioma* - glioma maligno). Estas células foram obtidas de uma paciente de 44 anos cujo tumor se apresentava no estadio 4 de desenvolvimento. Assim sendo, as U-87 são células de glioblastoma, derivadas de glioma maligno humano com características epiteliais aderentes.

As células MCF-7 são células de adenocarcinoma mamário obtidas através de efusão pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos com um carcinoma mamário metastizado após radioterapia e hormonoterapia. Estas células apresentam características epiteliais, desenvolvem-se em monocamadas e apresentam positividade para recetores citoplasmáticos de estrogénios.

As células do carcinoma da próstata, também denominadas LNCaP, apresentam características aderentes, crescendo em agregados ou individualizadamente. Estas células foram inicialmente obtidas a partir de uma metástase presente num linfonodo de um homem com carcinoma da próstata. Estas células apresentam a particularidade de serem sensíveis a androgénios.

Por ultimo, as células NHDF (*Primary Normal Human Dermal Fibroblasts*) são células isoladas a partir da derme de prepúcio juvenil ou de pele adulta de diferentes locais como o rosto, os seios, abdómen ou coxas. Estas células aderentes caracterizam-se pela sua morfologia fusiforme.

### 3.2.2 - Cultura e manutenção das linhas celulares

Para garantir a manutenção das linhas celulares em condições estéreis, estas foram manipuladas em câmaras de fluxo laminar apropriadas. Foram também garantidos os cuidados de assepsia por parte do operador de modo a evitar contaminações.

Durante o decorrer das experiências, cada linha foi mantida no meio de cultura adequado de modo a estarem reunidas as condições necessárias ao crescimento e desenvolvimento celular. A substituição do meio foi realizada a cada 2-3 dias e quando se atingia a confluência celular, as células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura.

As células, para além da necessidade de um suporte sólido para crescerem e proliferarem, são sensíveis a vários fatores, como a temperatura ou a composição do ar. Assim sendo, de modo a manter um ambiente estável de temperatura e humidade, as células foram mantidas a 37°C e num ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> garantindo assim as condições favoráveis ao seu normal desenvolvimento.

Sempre que necessário as células foram observadas ao microscópio ótico permitindo o acompanhamento do crescimento celular assim como o possível aparecimento de contaminações.

Os materiais que não se encontravam estéreis quando adquiridos foram submetidos à esterilização através de calor húmido e pressão (autoclave).

Após a sua utilização, todos os materiais como: pontas, pipetas volumétricas, tubos de centrifugação e frascos foram desinfetados com lixívia e adequadamente descartados.

### 3.2.3 - Preparação dos Meios de Cultura

Como referido anteriormente, para que se obtenha um adequado crescimento e diferenciação celular, cada linha celular foi semeada no meio de cultura mais apropriado. Para além disso, cada meio foi suplementado com soro e antibióticos/antifúngicos também adequados a cada linha.

**Tabela 1 - Características do Meio de Cultivo das linhas celulares:** tipo, características e suplementos adicionados a cada meio utilizado para linhas celulares utilizadas em estudo: U-87, MCF-7 e LNCaP.

Linha Celular	Meio	Suplementos
U-87	DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	10% FBS (Fetal Bovine Serum - Soro Fetal Bovino) 1% antibiótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina-B) 2,5g/L de NaHCO <sub>3</sub>
MCF-7	DMEM	10% FBS 1% antibiótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina-B) 2,5g/L de NaHCO <sub>3</sub>
LNCaP	RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )	10% FBS 1% estreptomicina (10,000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) 2g/L de NaHCO <sub>3</sub>
NHDF	RPMI	10% FBS 1% estreptomicina (10,000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) 2g/L de NaHCO <sub>3</sub> 2,16g/L de HEPES 0,25g/L de Glutamina 0,092g/L de Piruvato

Após a dissolução do meio comercial e a adição do soro e antibiótico, efetuou-se a esterilização do meio por filtração sob vácuo na câmara de fluxo laminar.

### 3.2.4 - Descongelamento

As células utilizadas neste estudo foram preservadas em azoto líquido tendo sido necessário recorrer ao seu descongelamento. Para tal, as alíquotas de U-87 foram transferidas para a câmara -80°C durante aproximadamente 5 horas garantindo assim um descongelamento gradual. Já as alíquotas de MCF-7, LNCaP e NHDF foram retiradas do azoto líquido e deixadas descongelar à temperatura ambiente. Os meios de cultura foram aquecidos a 37°C e o conteúdo de cada alíquota foi transferido para um tubo de centrifugação com a quantidade de meio adequada (5mL). Procedeu-se então à sua centrifugação a 990 rpm durante 3 minutos para as U-87 e a 1000 rpm durante 8 minutos para as restantes linhas. O sobrenadante foi descartado de modo a remover todo o meio de criopreservação (contendo DMSO) e o *pellet* obtido foi ressuspensão em novo meio de cultura. Por fim as células foram cultivadas em frascos de cultura (T-Flasks) de 25 cm<sup>2</sup> e/ou 75 cm<sup>2</sup> e mantidas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A substituição do meio foi realizada a cada 2-3 dias e as

células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura sempre que se atingia a confluência celular.

### 3.2.5 - Tripsinização

Após a sementeira e incubação nos frascos de cultura, as células cresceram e diferenciaram-se ao longo do tempo. Quando atingiram cerca de 80-90% da confluência celular, as células foram submetidas ao processo de tripsinização e foram expandidas para novos frascos de cultura. Para a realização desta técnica é necessário aspirar sob vácuo o meio de cultura do interior do frasco e lavar as células com PBS a 37°C (cerca de 5mL/frasco de cultura-de 25 cm<sup>2</sup> e/ou 10mL/frasco de cultura 75 cm<sup>2</sup>). De seguida aspirou-se o PBS, adicionou-se a tripsina (1,5mL/25 cm<sup>2</sup> ou 3mL/75 cm<sup>2</sup>) e incubou-se durante 3-5 minutos na estufa a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, de modo a permitir a desagregação das células da superfície do frasco. As células foram observadas ao microscópio garantindo que estas se encontravam em suspensão. Adicionou-se então de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e antibiótico a 37°C de modo a neutralizar a tripsina (3,5mL/25 cm<sup>2</sup> e/ou 7mL/75 cm<sup>2</sup>). As células foram então transferidas para um tubo e centrifugadas durante 3 minutos a 150g (U-87) e 8 minutos a 1000 rpm (restantes linhas). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspensão em meio de cultura (volume ajustado à quantidade de *pellet*). Por último as células foram transferidas para novos frascos de cultura continuando assim o processo de crescimento e expansão celular.

### 3.2.6 - Contagem e sementeira de células

A sementeira das células realizou-se quando se pretendia avaliar o efeito dos compostos em estudo na proliferação celular. Para o ensaio em causa, é necessário obter uma concentração pré-definida de células por poço. Assim sendo, de acordo com o descrito na seção anterior (tripsinização), após ressuspender o *pellet* em meio de cultura, procedeu-se à contagem das células. Para tal, fez-se uma diluição 1:1 da suspensão celular com a solução azul de triptano. A mistura resultante é colocada sob uma lamela na câmara de Neubauer e observada ao microscópio. As células viáveis foram contadas em quatro quadrantes da câmara e a concentração celular foi determinada. Após efetuada uma suspensão celular com a concentração pretendida (2x10<sup>4</sup> células/ml) procedeu-se à distribuição das células. Para tal, 250µL de suspensão celular final foi transferida para cada poço (exceto nos poços destinados ao controlo sem células). Após plaqueamento, as células foram incubadas durante 24-48 horas (37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>), de modo a promover o crescimento e aderência celular.



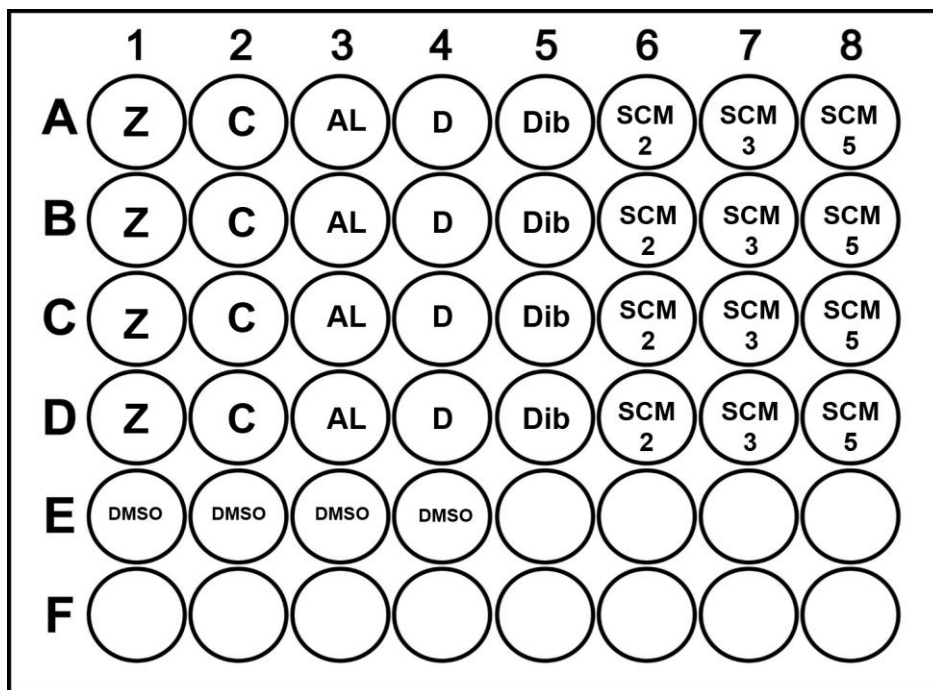
### 3.2.7 - Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular

Para avaliar o efeito citotóxico dos compostos foram preparadas soluções concentradas (600uL, 10mM) dos seguintes compostos: AL, SCDiol, SCDib, SCM2, SCM3, SCM5.

De modo a avaliar o efeito destes compostos na proliferação celular após 24-48h em cultura as células, foram, num primeiro ensaio, expostas aos compostos numa concentração 30µM, (*screening*). Foi realizado um controlo de células sem composto, e um controlo de células expostas apenas ao solvente orgânico utilizado para solubilizar os compostos (1% de DMSO).

Antes de realizar o ensaio, as células foram observadas ao microscópio. Após verificar a sua viabilidade, foi aspirado o meio de cada poço e foram adicionadas as soluções com os diferentes compostos a cada poço sendo sempre feitos 4 replicados para cada condição. (Figura 14).

As células foram incubadas com os compostos durante 72h e no final deste período, foram observadas ao microscópio ótico de modo a observar o efeito dos compostos: aumento ou diminuição do número de células, alteração da conformação das células ou morte celular.

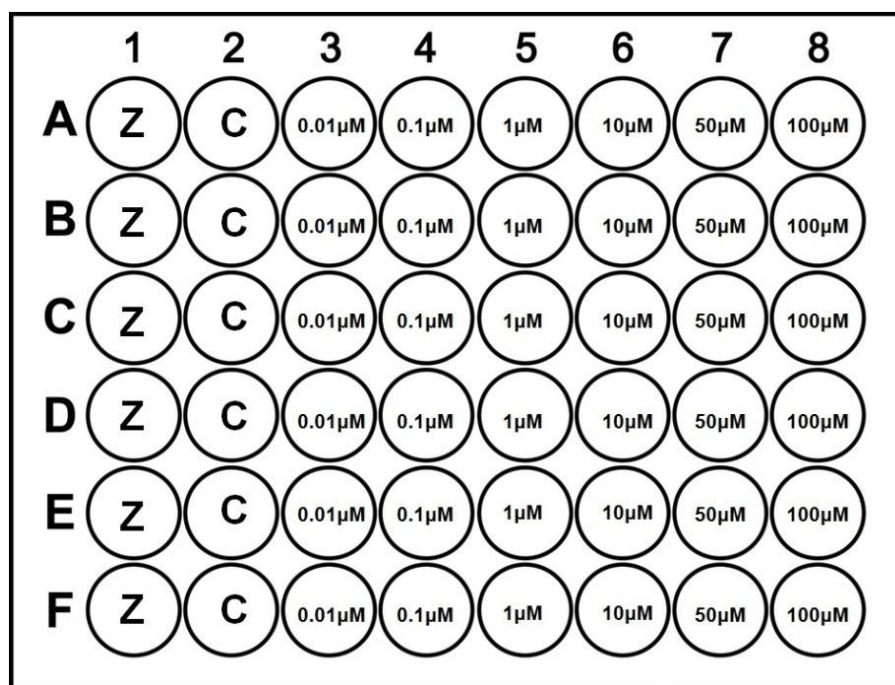


**Figura 14** - Esquema representativo da microplaca para o ensaio de *screening* dos compostos numa concentração de 30µM. (Z=Zero; C=Controlo; AL=Ácido litocólico; D=Diol; Dib=Dibromo; SCM2, SCM3, SCM5 (Compostos SCM2 a SCM5); DMSO= dimetilsulfóxido).

Após este ensaio preliminar, os compostos que apresentaram atividades antiproliferativas relevantes (<50%), foram selecionados para um ensaio de concentração-resposta, permitindo também a determinação do IC<sub>50</sub> (concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento celular).

Para este teste, foram preparadas soluções diluídas de cada composto com diferentes concentrações: (Figura 14): 0,01µM; 0,1µM; 1µM; 10µM; 50µM e 100µM (6 replicados para cada condição).

Após aspiração do meio do poço incubaram-se as células com os compostos durante 72h. Após este período foi avaliada a viabilidade celular através do ensaio do MTT.



**Figura 15** - Esquema representativo das microplacas para o ensaio da determinação do IC<sub>50</sub>. Curva concentração-resposta, com uma gama de diferentes concentrações (0.01µM a 100µM). Foram realizados ensaios com n=5 para todas as concentrações, zero e controlo, em células MCF-7, LNCaP e U-87.

### 3.2.8 - Ensaio de proliferação celular-MTT

Para a avaliação a citotoxicidade dos compostos nas células e para as curvas de concentração-resposta foi realizado o ensaio de MTT (3 brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Na maioria das células viáveis, a atividade das mitocôndrias é constante e como tal, um aumento ou uma diminuição no número de células viáveis irá relacionar-se com esta atividade. Através deste ensaio, a viabilidade das células é avaliada através da capacidade das suas mitocôndrias converterem o sal detetrazólio de cor amarela quando

solubilizado em água em cristais de formazano, de cor arroxeadada e insolúveis em água. Uma vez que se trata de um ensaio colorimétrico, após a diluição dos cristais, procede-se à leitura da absorvância. Assim, a quantidade de formazano (diretamente proporcional ao número de células viáveis) é registada através das alterações da absorvância a 570nm.

Assim sendo, após o período de incubação das células com os compostos em estudo, procedeu-se à aspiração do sobrenadante dos poços e conseqüente lavagem com PBS. Após este passo, adicionaram-se 250µl MTT (0,5mg/mL) preparado em meio de cultura incompleto. A solução de MTT foi mantida em contacto com as células durante aproximadamente 60-90 minutos, em atmosfera de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e ausência de luz. Terminado o período de incubação o sobrenadante dos poços foi aspirado cuidadosamente de modo a preservar os cristais, e seguidamente, procedeu-se à adição de 250µl de solução de isopropanol em HCl (4 M) permitindo a sua solubilidade e obtendo-se uma solução de cor roxa. A absorvância foi lida no leitor de placas a 570nm. Os valores das absorvâncias dos compostos são comparados com os valores do controlo (correspondentes a100%).

### 3.2.9 - Análise Estatística

Os valores obtidos por leitura das absorvâncias nos ensaios MTT foram analisados permitindo calcular a percentagem da proliferação celular dos compostos a diferentes concentrações. Para tal, após descontar o valor do zero, a absorvância de cada composto foi comparada com a absorvância obtida na ausência de qualquer composto. Os gráficos finais estão apresentados sob a forma de valores médios ± desvio padrão. Para avaliar e verificar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre condições experimentais foi aplicado o teste *t*-student. Estes valores foram classificados como significativos quando  $p < 0,05$ . Para o cálculo do IC<sub>50</sub>, foram utilizados os valores obtidos nas curvas concentração-resposta sendo utilizado um ajustamento sigmóide. Todos os dados estatísticos foram tratados e analisados recorrendo ao *software* GraphPad Prism 5.

### 3.2.10 - Ensaio de Fluorescência

Previamente foi determinada a absorvância máxima de cada composto e traçados os espectros de emissão e de excitação dos compostos no fluorímetro utilizando as soluções dos compostos de concentração 10 $\mu$ M.

Para os estudos de fluorescência, as células foram tripsinizadas e semeadas em lamelas revestidas com poli-D-lisina numa concentração de 10x10<sup>4</sup> células/mL. Após 24 horas, o meio foi aspirado e foram aplicados os compostos numa concentração de 10 $\mu$ M. Procedeu-se a incubação de 72 horas dos compostos.

Posteriormente, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS e foram adicionados os corantes fluorescentes (tabela 2) que funcionam como sondas dos organelos celulares. Após incubação das sondas durante o tempo estipulado, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e as lamelas foram montadas nas lâminas recorrendo ao meio de montagem DACO.

Tabela 2 - Sondas utilizadas para a localização dos compostos nas células.

Sonda	Comprimentos de onda	Concentração	Tempo de incubação	Organelo marcado
Hoechst 33342	excitação: 361nm; emissão: 497nm	1 $\mu$ M (PBS com 1% de TBS)	10 min.	Núcleo
MitoTracker Green	excitação: 488nm; emissão: 550nm	25nM (PBS)	30 min	Mitocôndria
ER-GFP	excitação: 488nm; emissão: 545nm	0,5 $\mu$ M (PBS)	15 min	Reticulo endoplasmático
LisoTracker Green	excitação: 488nm; emissão: 550nm	60nM (PBS)	30 min	Lisossoma

A visualização das lamelas e as alterações morfológicas foram observadas num microscópio de epifluorescência com uma ampliação de 63 vezes.

### 3.3 - Ensaio de dicroísmo circular (CD)

Todas as experiências de dicroísmo circular foram realizadas num espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um controlador de temperatura Peltier CDF-426S e usando uma célula de 2mm. A aquisição dos espectros de CD dos diversos ensaios foi realizada com o *software* Spectra Manager™ - Jasco.

Neste ensaio foram adquiridos espectros recorrendo a duas sequências de oligonucleótidos: sequência telomérica humana - Tell22 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' e sequência promotora de c-MYC mutada 5'-TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-3'.

Estas sequências foram adquiridas aos laboratórios Stabvida. Os stocks de DNA foram preparados com o tampão fosfato (15mM) em água mili-Q à concentração de 0,5mM / cadeia.

Antes de realizar os ensaios, as sequências foram preparadas no tampão adequado (Tell22 em 100mM de KCl e a 100mM de NaCl; c-MYC em 100mM de KCl; DNA em concentrações de 10 $\mu$ M e 5 $\mu$ M respetivamente. A topologia de G-quadruplex foi induzida através do aquecimento da solução a 95°C seguida do seu arrefecimento lento até à temperatura ambiente.

Foram realizados espectros das sequências de oligonucleotídeos a 25°C a posteriormente foram adicionados vários equivalentes de composto permitindo a realização de uma titulação. Os espectros foram obtidos entre 190nm e 300nm, com uma acumulação de 3 varrimentos, incremento de 1nm, tempo de integração de 100ms segundos por ponto e velocidade de acumulação de 100nm/min.

Foram também calculadas as temperaturas de *melting* dos oligonucleotídeos na presença e na ausência de composto. O comprimento de onda monitorizado para as duas sequências foi 264nm sendo que a gama de temperaturas variou de 25°C a 100 °C (4°/minuto) com um tempo de estabilização de 4 segundos.

Todos os resultados experimentais de CD foram analisados e normalizados com o auxílio do programa Origin9 (OriginLab Corporation)

### 3.4 - Ensaio FRET

Os ensaios de FRET *melting* foram realizados em colaboração com Dr. Jean-Louis Mergny, no IECB, Universidade de Estrasburgo. Para este ensaio foi utilizada a sequência telomérica de 21 pares de bases (5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') que reproduz a cadeia rica em guaninas presente nos telómeros dos vertebrados. Às extremidades 5' e 3' desta sequência foram acopladas uma molécula de fluoresceína (FAM) e uma molécula de tetrametilrodamina (TAMRA) respetivamente. Os compostos foram solubilizados em DMSO e incubados com esta sequência a diferentes concentrações.



## Capítulo 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 - Síntese Química

No decorrer deste trabalho foram sintetizados vários macrociclos derivados do ácido litocólico com o objetivo de interagirem e estabilizarem estruturas de G-quadruplex. Após revisão da literatura sobre os ligandos existentes e as suas características, esta família de compostos foi selecionada uma vez que os derivados de esteroides são potenciais agentes anti tumorais. De forma a direcionar estes compostos para o G-quadruplex, a síntese foi delineada de modo a adicionar anéis aromáticos, para potenciar o empilhamento com as G-tétradas e aminas de forma a potenciar a interação com as cadeias de DNA.

Após a sua síntese, pretendeu-se avaliar a interação com estruturas de G-quadruplex por dicroísmo circular e a sua ação anti proliferativa em células cancerígenas e células normais humanas.

Os presentes derivados de esteroides foram sintetizados primeiramente pela redução do ácido litocólico a um álcool primário através do borohidreto de sódio um comum agente redutor de aldeídos e cetonas a álcoois. Posteriormente, este álcool foi convertido a 3,24-bis(halogenatedariloxi)colane através da reação de Mitsunobu. Nesta reação os ácidos carboxílicos são esterificados com álcoois primários ou secundários através de um sistema redox recorrendo ao azodicarboxilato (DEAD) e trifetilfosfina (TEAP). No último passo, o 3,24-bis(halogenatedariloxi)colane foi acoplado a diferentes poliaminas recorrendo ao complexo catalizador  $[Pd(dba)_2]/BINAP$  proposto por Buchwald<sup>(59)</sup>.

Após a síntese destas moléculas, a avaliação da interação/estabilização com o DNA, mais especificamente com estruturas de G-quadruplex, foi realizada por FRET-*melting* e CD. Através desta estratégia, pretende-se estudar o desenvolvimento de novas terapias a nível oncológico com ação no G-quadruplex. Por complemento a estes ensaios de interação, os estudos de citotoxicidade permitirão a compreensão do seu potencial anticancerígeno e/ou anti proliferativo.

### 4.2- Avaliação da formação de estruturas de G-quadruplex: dicroísmo circular

Antes de efetuar a avaliação da interação dos compostos sintetizados com o G-quadruplex foi necessário promover a formação desta estrutura nas sequências estudadas assim como determinar a estabilização do G-quadruplex após adição de composto através da temperatura

de *melting*. Para tal, as sequências *c-MYC* e *Tell22* foram preparadas em soluções de NaCl ou KCl e foram submetidas a um aquecimento (cerca de 90°C durante 10 minutos) seguido de um arrefecimento em gelo de modo a potenciar a formação de G-quadruplex. Foram adquiridos espectros de dicroísmo das sequências de modo a identificar a tipologia de G-quadruplex. Para estes estudos foi selecionada a sequencia *c-MYC* (sequência de promotor oncogene) e a sequência *Tell22* (sequência telomérica) representadas nas figuras 16,17 e 18.

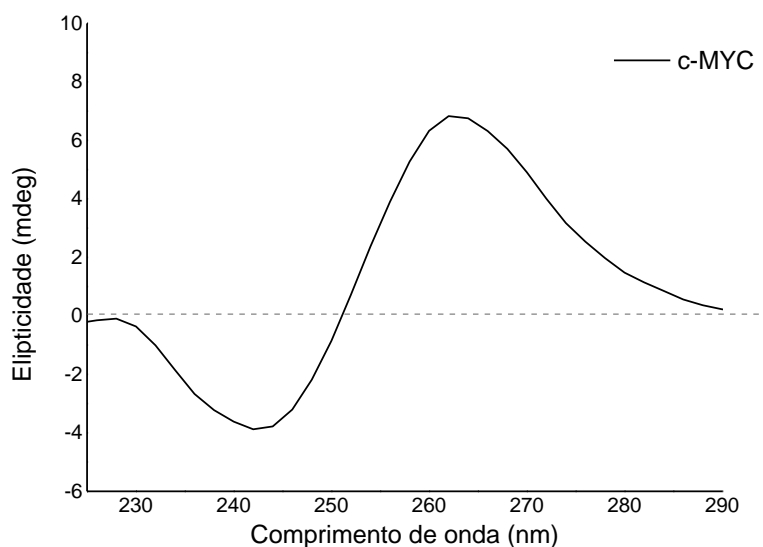


Figura 16 - Espectro dicroísmo circular da sequência *c-MYC* (5  $\mu$ M) em solução de 100mM de KCl a 25°C

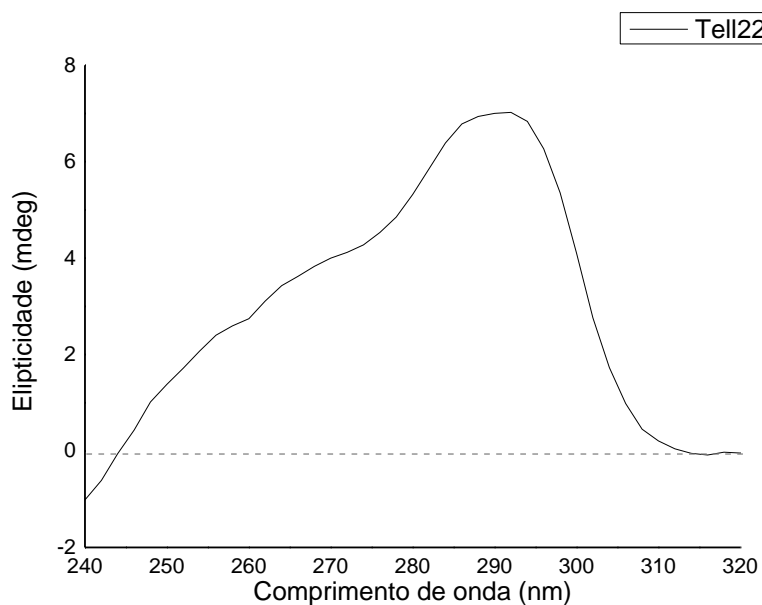
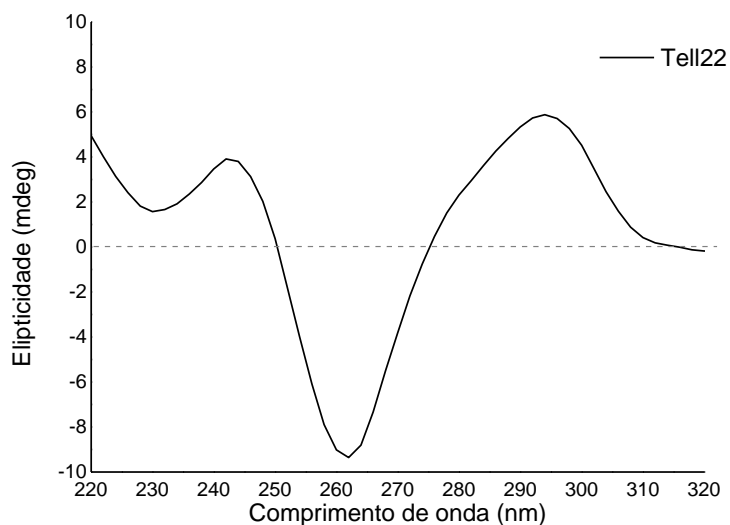


Figura 17 - Espectro dicroísmo circular da sequência *Tell22* (10 $\mu$ M) em solução de 100mM de KCl a 25°C.





**Figura 18** - Espectro dicroísmo circular da sequência *Tell22* (10 $\mu$ M) em solução de 100mM de NaCl a 25°C.

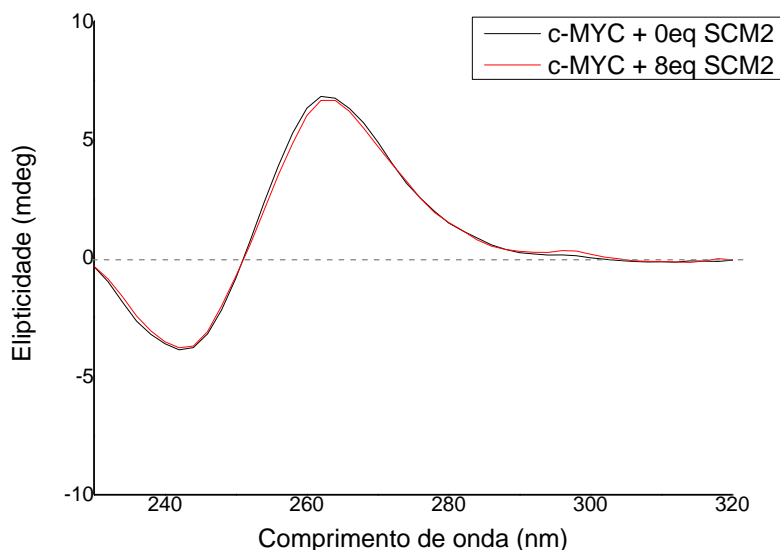
Como podemos observar na figura 16, o espectro da sequência *c-MYC* preparada em solução de KCl (100mM) apresenta uma banda de elipticidade positiva a 264nm e uma banda negativa a 244nm, característico de um G-quadruplex de topologia paralela<sup>(60)</sup>. O espectro apresentado na figura 17, é correspondente à sequência *Tell22* também preparada em tampão KCl (100mM). Neste espectro é observada uma banda positiva a 290nm e uma negativa a 240nm que são bandas características de G-quadruplex de topologia híbrida<sup>(61)</sup>.

A sequência *Tell22* foi também preparada numa solução de NaCl (100mM) onde são observadas duas bandas positivas a 216nm e 294nm e uma negativa a 264nm sendo tal representativo de um espectro de G-quadruplex de topologia antiparalela (Figura 18). Tal facto é sustentado pela literatura uma vez que foi demonstrado que soluções iónicas diferentes originam diferentes topologias de G-quadruplex<sup>(60, 61)</sup>.

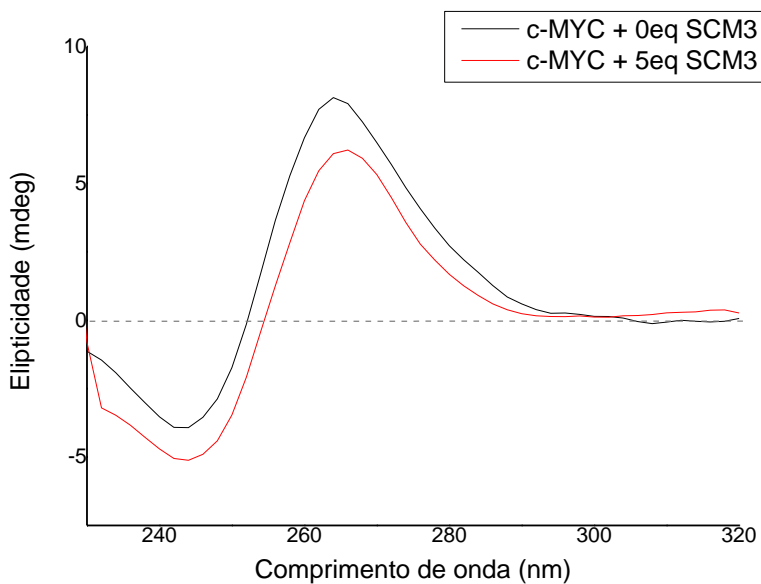
#### 4.2.1. - Interação de estruturas do G-quadruplex com os compostos sintetizados

Após o estudo das tipologias do G-quadruplex adotadas em solução procedeu-se à adição de uma solução de cada ligando previamente selecionado. Deste modo pretendeu-se evidenciar alterações no espectro de dicroísmo (correspondentes a alterações de topologia do G-quadruplex) ou alterações da temperatura de *melting* (correspondente à estabilização da estrutura). Para este estudo foram selecionados dois dos macrociclos sintetizados com

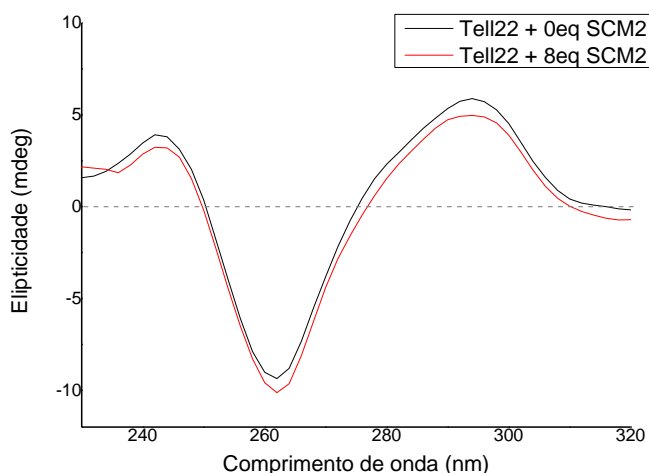
diferentes cadeias de amina de modo a avaliar a importância ou não deste grupo funcional na interação com o G-quadruplex. À solução inicial de DNA foram adicionados equivalentes de cada composto e foram adquiridos espectros de modo a monitorizar alterações no espectro.



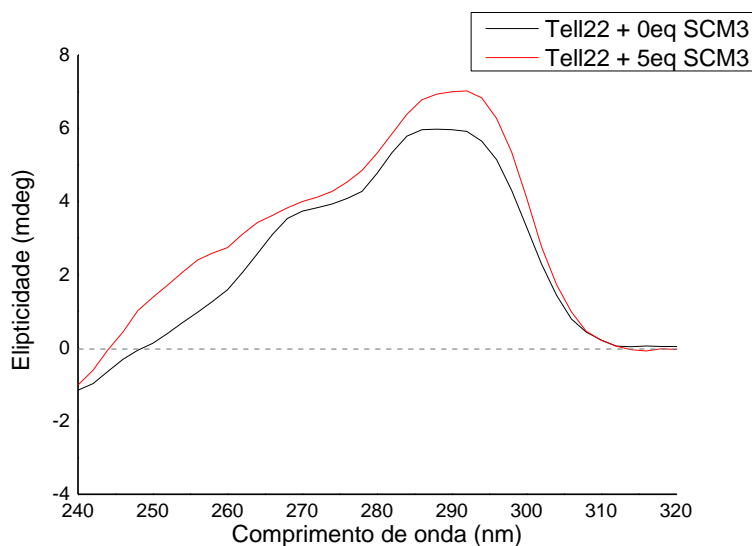
**Figura 19-** Espectro dicroísmo circular da sequência *c-MYC* (5 $\mu$ M) e *c-MYC* (5 $\mu$ M) + 8 equivalentes de composto SCM2 em solução de 100mM de KCl a 25°C.



**Figura 20 -** Espectro dicroísmo circular da sequência *c-MYC* (5 $\mu$ M) e *c-MYC* (5 $\mu$ M) + 5 equivalentes de composto SCM3 em solução de 100mM de KCl a 25°C.



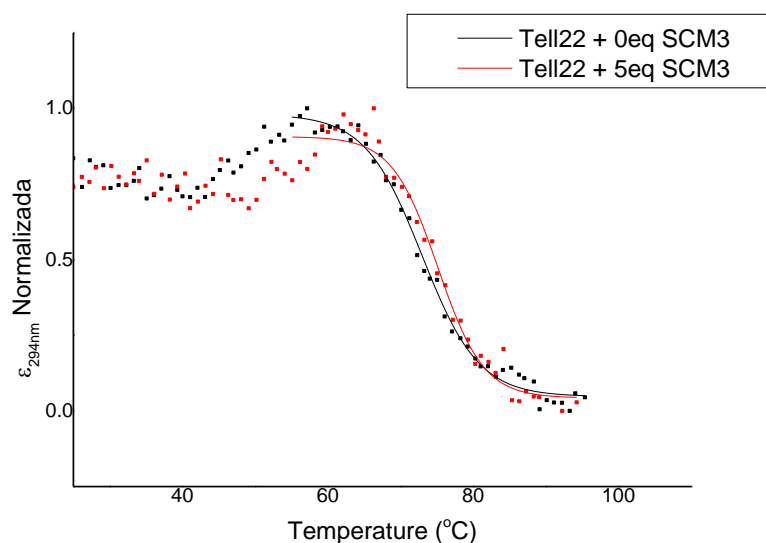
**Figura 21** - Espectro dicroísmo circular da sequência *Tell22* (10 $\mu$ M) e *Tell22* (10 $\mu$ M) + 8 equivalentes de composto SCM2 em solução de 100mM de NaCl a 25°C.



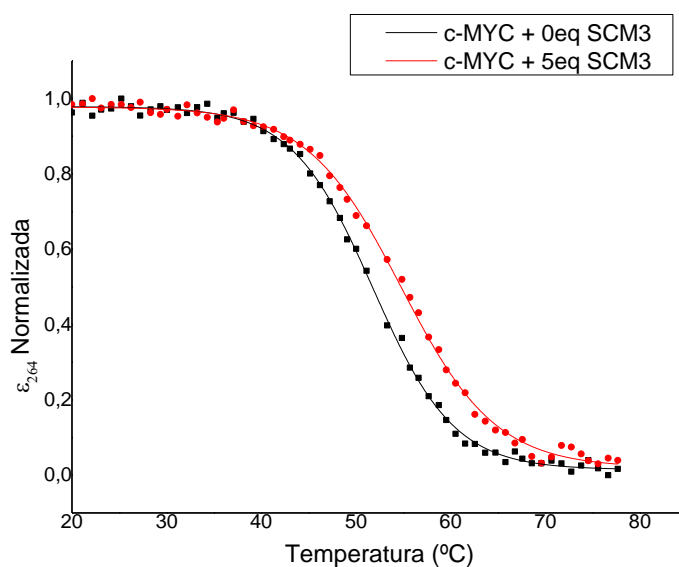
**Figura 22** - Espectro dicroísmo circular da sequência *Tell22* (10 $\mu$ M) e *Tell22* (10 $\mu$ M) + 5 equivalentes de composto SCM3 em solução de 100mM de KCl a 25°C.

De acordo com os resultados obtidos nas figuras 19,20,21 e 22, a adição de soluções de cada composto não alterou a tipologia do G-quadruplex das sequências testadas.

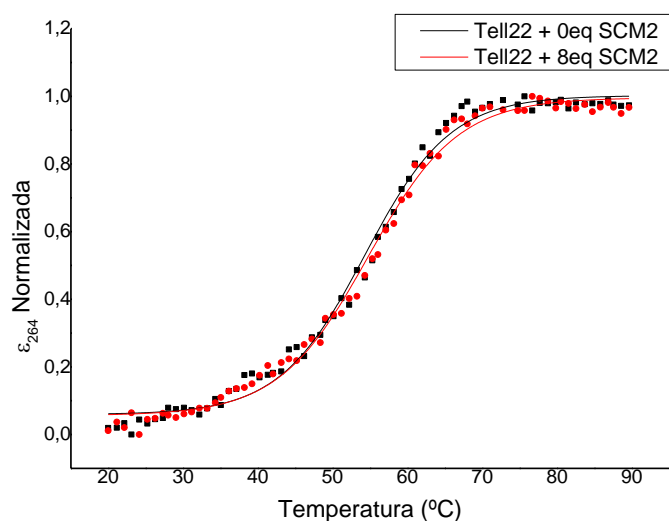
Posteriormente determinou-se por dicroísmo circular se os compostos estabilizavam as estruturas quadruplexes do *c-MYC* e *Tell22* através da determinação da temperatura de *melting*. A determinação da temperatura de *melting* e a sua alteração após a adição do ligando indica a capacidade deste ligando se ligar e estabilizar o G-quadruplex. Para tal, um comprimento de onda específico (uma banda característica) de cada sequência foi fixo e foi realizado um varrimento a diferentes temperaturas.



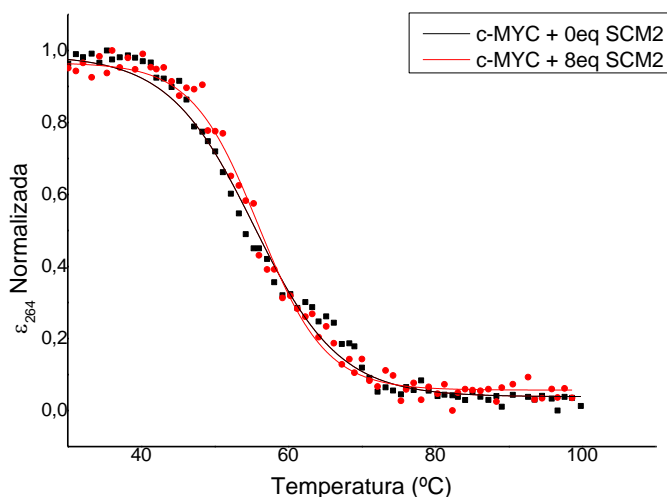
**Figura 23** - Curva de *melting* obtida por dicroísmo circular. Sequência *Tell22* G-quadruplex na presença e na ausência de 5 equivalentes do ligando SCM3. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 294nm. *Tell22* + 0eq de SCM3  $T_m=74,24^\circ\text{C}$ ; *Tell22* + 5eq de SCM3  $T_m=76,0^\circ\text{C}$ .



**Figura 24** - Curva de *melting* obtida por dicroísmo circular. Sequência *c-MYC* G-quadruplex na presença e na ausência de 5 equivalentes do ligando SCM3. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 264nm. *C-MYC* + 0eq de SCM3  $T_m=51,79^\circ\text{C}$ ; *c-MYC* + 5eq de SCM3  $T_m=54,78^\circ\text{C}$ .

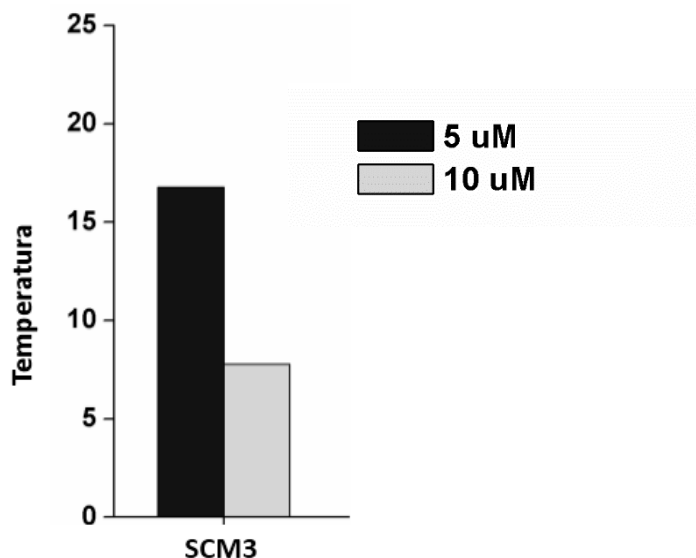


**Figura 25** - Curva de *melting* obtida por dicroísmo circular. Sequência *Tell22* G-quadruplex na presença e na ausência de 8 equivalentes do ligando SCM2. Amostra preparada em NaCl. Leitura efetuada a 264nm. *Tell22* + 0eq de SCM2  $T_m=54,30^\circ\text{C}$ ; *Tell22* + 8eq de SCM3= $54,74^\circ\text{C}$ .



**Figura 26** - Curva de *melting* obtida por dicroísmo circular. Sequência *c-MYC* G-quadruplex na presença e na ausência de 8 equivalentes do ligando SCM2. Amostra preparada em KCl. Leitura efetuada a 264nm. *c-MYC* + 0eq de SCM2  $T_m=55,33^\circ\text{C}$ ; *c-MYC* + 8eq de SCM3= $55,99^\circ\text{C}$ .

Como podemos observar, em ambas as sequências testadas na presença de composto SCM3 (5 equivalentes correspondente a  $50\mu\text{M}$  na *Tell22* e a  $25\mu\text{M}$  na *c-MYC*) foi verificado um aumento da temperatura de *melting*. No caso da sequência *Tell22* foi verificado um aumento da  $T_m$  de  $1,76^\circ\text{C}$  e na sequência *c-MYC* foi verificado um aumento de aproximadamente  $3^\circ\text{C}$ . Por outro lado, para o composto SCM2 o aumento de temperatura foi negligível ( $<1^\circ\text{C}$ ).



**Figura 27** - Ensaio FRET *melting*. Sequência *Tell21* (0,2µM) em tampão Li<sup>+</sup> cacodilato 10mM com 10mM de KCl+90mM LiCl, pH 7,2.

A fim de corroborar o efeito obtido por dicroísmo circular obtido para o composto SCM3, este foi testado no ensaio de FRET- *melting*. Neste ensaio, este composto demonstrou aumentar a temperatura de *melting* em aproximadamente 17°C e 7°C para 5µM e 10µM respectivamente (25 e 50 equivalentes respectivamente).

Os resultados do CD-*melting* juntamente com FRET-*melting*, sugerem que o composto SCM3 interage e estabiliza a estrutura telomérica *Tell21* híbrida do G-quadruplex. Os mesmos resultados de CD-*melting* indicam que esta estabilização ocorre também na estrutura paralela da sequência *c-MYC*.

Estudos semelhantes realizados com compostos que já mostraram interagir e atuar a nível do G-quadruplex demonstram igualmente a alteração da temperatura de *melting* após adição do composto. Em estudos de FRET-*melting* realizados com a porfirina TMPyP4 foi possível verificar que apenas 1µM deste composto aumentou a temperatura de *melting* de uma sequência telomérica (AG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub>) em cerca de 20,9°C em sódio e de 54°C em potássio. Já o poli-oxazol, telomestatina, com a mesma concentração aumentou a temperatura de *melting* em cerca de 23°C tanto em sódio como em potássio<sup>(62)</sup>.

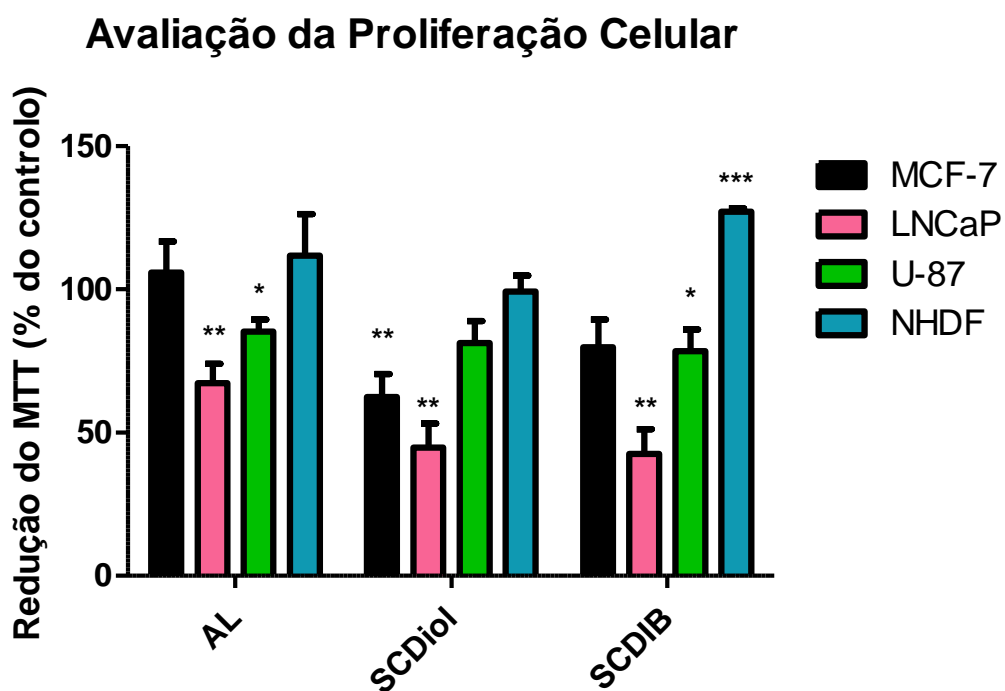
Tendo em conta os resultados obtidos, assim como, as referências mencionadas, podemos caracterizar o composto SCM3 como promissor em estudos futuros de G-Quadruplex inclusive com sequências promotoras de oncogenes e sequências teloméricas. A este esteroide poderão ser incorporados mais nitrogénios ou poderá ser derivatizado com outras cadeias de aminas de modo a torná-lo mais específico e a potenciar a sua estabilização.

## 4.3 - Avaliação Biológica

### 4.3.1 - Análise da citotoxicidade em células U-87, MCF-7, LNCaP e NHDF

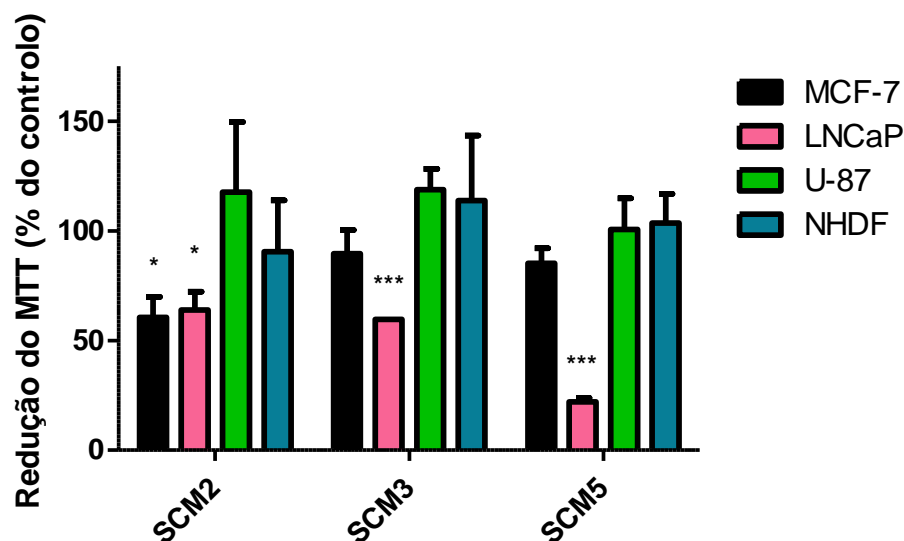
A fim de avaliar a capacidade anti tumoral dos macrociclos e intermediários em células humanas tumorais e células humanas normais, foi realizado o ensaio MTT. De modo a avaliar a citotoxicidade destes compostos foi primeiro realizado um ensaio com apenas uma concentração dos diferentes compostos. Assim, as diferentes linhas celulares (MCF-7, LNCaP, U-87 e NHDF) foram incubadas com os diferentes compostos (AL, SCDiol, SCDib, SCM2, SCM3 e SCM5) à concentração de 30 $\mu$ M durante 72h. O tempo de exposição das células tratadas com os compostos foi de 72h devido ao facto do ciclo celular destas células ser entre 18h e 34h. Deste modo torna-se possível analisar o efeito biológico dos compostos em pelo menos um ciclo celular completo.

Os resultados obtidos neste estudo inicial estão representados nas figuras 28 e 29.



**Figura 28** - Avaliação da proliferação celular por ensaio MTT - utilizando os intermediários da síntese dos macrociclos. Percentagens da proliferação celular em relação ao controlo (na ausência de qualquer composto) nas diferentes linhas celulares, após tratamento com os compostos precursores de macrociclos (30 $\mu$ M) durante 72 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).

## Avaliação da Proliferação Celular - Macrosciclos



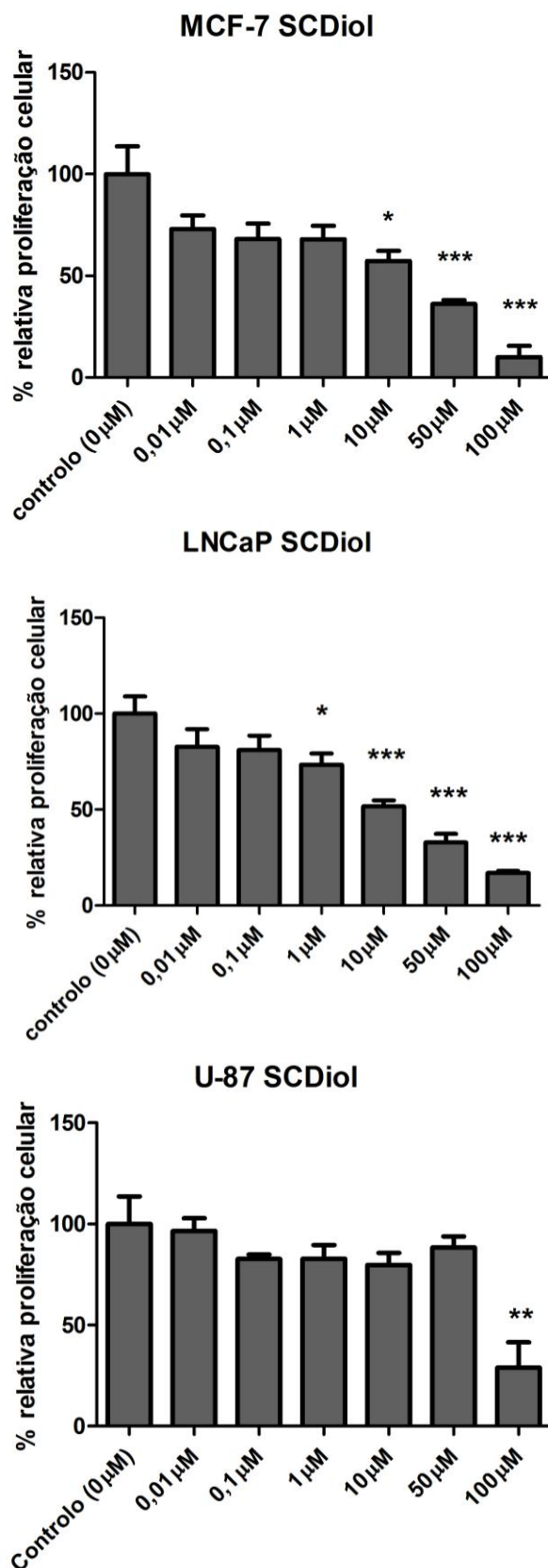
**Figura 29** - Avaliação da proliferação celular por ensaio MTT - utilizando os macrosciclos. Percentagens da proliferação celular em relação ao controlo (na ausência de qualquer composto) nas diferentes linhas celulares, após tratamento com os macrosciclos (30 $\mu$ M) durante 72 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaios em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).

Os resultados a nível celular indicam que os compostos com maior citotoxicidade foram os intermediários SCDiol, SCDib e o macrosciclo SCM5, sendo a linha celular LNCaP mais sensível a estes compostos. Os compostos macrosciclos SCM2 e SCM3 também demonstraram alguma capacidade anti proliferativa nomeadamente nas linhas celulares MCF-7 e LNCaP. Nas outras linhas celulares nomeadamente nas U-87 e nas NHDF os compostos testados não demonstraram capacidade anti proliferativa considerável. Após análise destes resultados, os compostos com maior citotoxicidade (<50%) nas diferentes linhas celulares, foram sujeitos a experiências para determinação de curvas concentração-resposta com o objetivo de se estabelecer relações dos efeitos do composto com as concentrações testadas. Neste âmbito, seguiu-se a determinação da concentração de composto que permite inibir 50% da proliferação celular em relação à ausência do mesmo (IC<sub>50</sub>). Esta etapa revelou-se importante na conceção e desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos.

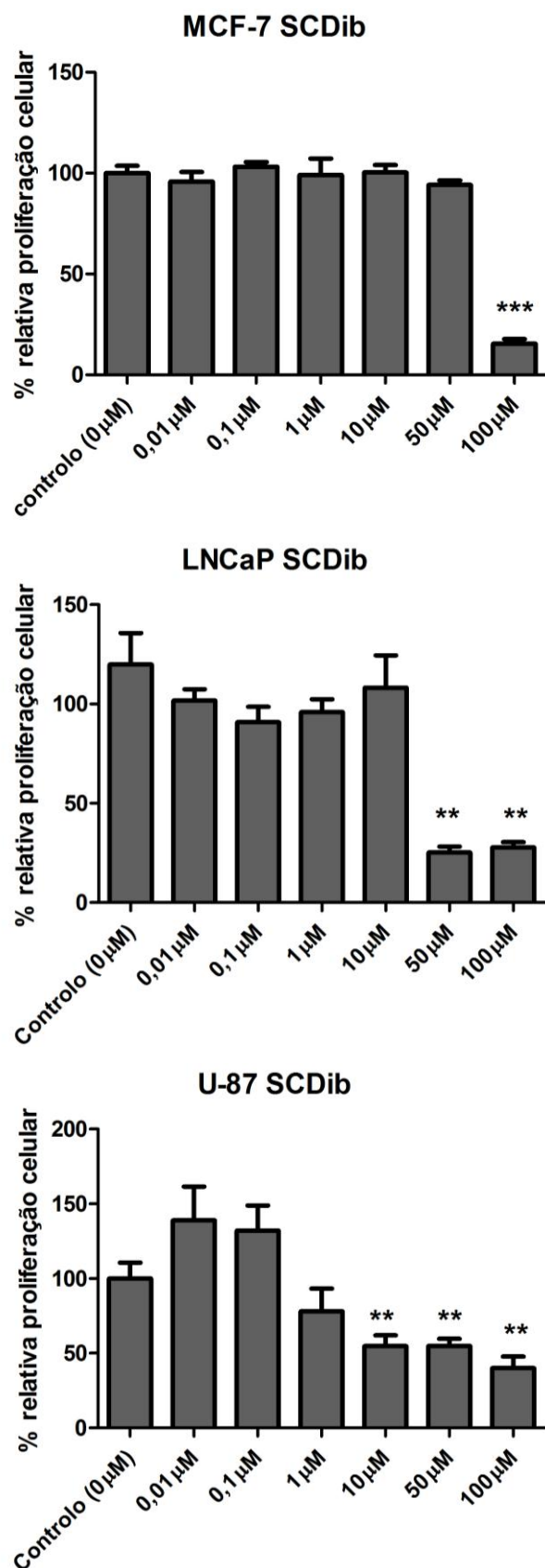
### 4.3.2 - Determinação do IC<sub>50</sub>

No seguimento do estudo da avaliação biológica dos compostos SCDiol, SCDib e SCM5 foi determinado o IC<sub>50</sub> através da incubação das células MCF-7, LNCaP e U-87 com estes compostos num intervalo de concentrações entre 0,01 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, durante 72h. Após este tempo de exposição, procedeu-se ao ensaio de MTT. Os resultados do efeito dos compostos avaliados nas linhas celulares estão representados nas figuras 30 a 32.

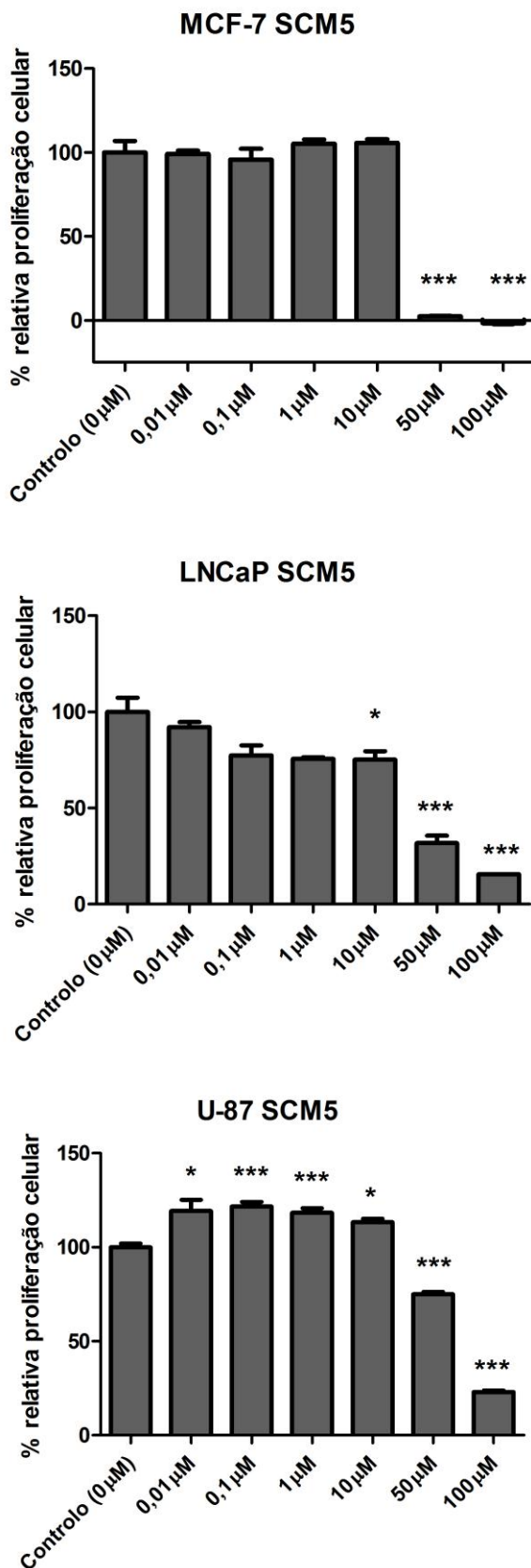




**Figura 30** - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCDiol em concentrações entre 0,01μM e 100μM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).



**Figura 31** - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCDib em concentrações entre 0,01μM e 100μM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).



**Figura 32** - Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, LNCaP e U-87 após o tratamento com o composto SCM5 em concentrações entre 0,01µM e 100µM, durante 72 h, realizados pelo ensaio MTT (570nm). Os dados são expressos em relação ao controlo como médias ± desvio padrão. \*p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio em cinco preparações celulares diferentes, realizadas em triplicado (concentração=2x10<sup>4</sup>células/mL).

Os valores de proliferação relativa celular obtidos no ensaio anterior foram utilizados para o cálculo do IC<sub>50</sub> apresentado na tabela 3.

**Tabela 3** - Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos SCDiol, SCDib e SCM5 em linhas de células MCF-7, LNCaP e U-87

Composto	LNCaP IC <sub>50</sub>	MCF-7 IC <sub>50</sub>	U-87 IC <sub>50</sub>
SCDIol	6,85 (r <sup>2</sup> =0.932)	3,71 (r <sup>2</sup> =0.740)	80,87 (r <sup>2</sup> =0.649)
SCDib	42,22 (r <sup>2</sup> =0.872)	76,84 (r <sup>2</sup> =0.995)	40,16 (r <sup>2</sup> =0.641)
SCM5	14,64 (r <sup>2</sup> =0.8150)	39,18 (r <sup>2</sup> =0.9941)	69,70 (r <sup>2</sup> =0.824)

A determinação dos IC<sub>50</sub> permitiu aferir quais os compostos que apresentam uma resposta em função da concentração administrada. O composto SCDiol foi o composto que demonstrou o valor de IC<sub>50</sub> mais baixo tanto para as células MCF-7 como para as LNCaP (3,71 e 6,85 respectivamente). Contudo, não demonstrou ter citotoxicidade para a linha celular U-87 (IC<sub>50</sub>=80,87). O composto SCDib demonstrou ter uma maior citotoxicidade para as células LNCaP e para as U-87 (42,22 e 40,16, respectivamente) sendo que para estas células é necessária uma menor concentração de composto para verificar o efeito desejado. Por último o composto SCM5 demonstrou um menor IC<sub>50</sub> nas células LNCaP (IC<sub>50</sub>=16,64) tendo por isso um maior efeito citotóxico neste tipo celular.

#### 4.4 - Ensaios de Fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados para visualizar a entrada dos compostos no interior das células e, em caso positivo, qual sua localização na célula. Assim, foram determinados os espectros de excitação e emissão de cada composto a fim de aferir os comprimentos de onda a que necessitam de ser excitados e aos quais emitem fluorescência (tabela 4).

**Tabela 4** - Valores de excitação e emissão máxima dos compostos sintetizados SCDib, SCM2, SCM3 e SCM5.

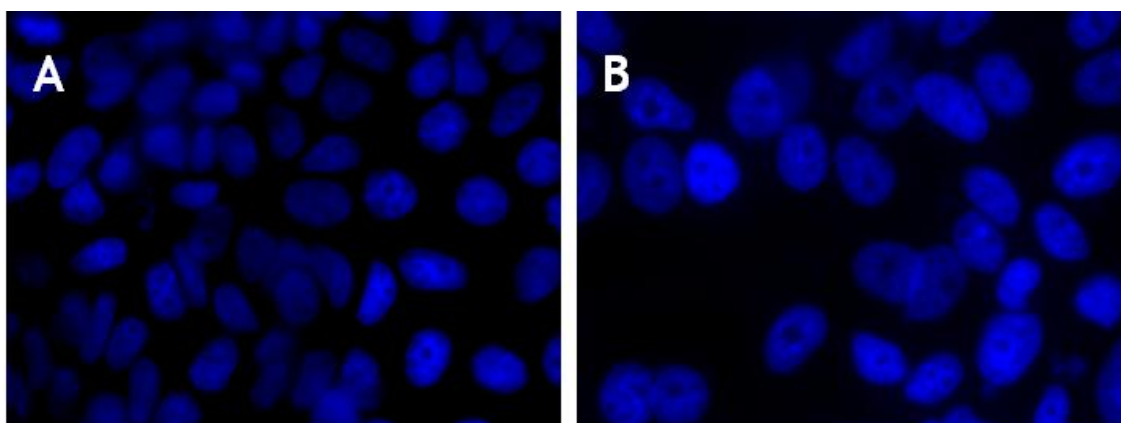
Composto	Ex <sub>max</sub>	Em <sub>max</sub>
SCDib	275nm	389nm
SCM2	260nm	400nm
SCM3	260nm	416nm
SCM5	250nm	398nm

Foram realizados ensaios para determinar a internalização celular e conseqüente localização. Após a incubação com os compostos em estudo, as células MCF-7 foram expostas aos

diferentes marcadores celulares de modo a compreender se os compostos penetravam na célula e se localizavam o núcleo permitindo a sua associação ao G-quadruplex. Assim, foram utilizadas sondas para o núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e lisossoma. Na observação das células ao microscópio, foi possível observar autofluorescência das mesmas não se verificando um aumento desta após a incubação com os compostos. Tais resultados não nos permitem concluir a internalização do composto na célula. Também verificou-se que os comprimentos de onda de excitação dos compostos se encontravam abaixo do limite mínimo de excitação do laser do microscópio confocal, invalidando a recolha de imagens e resultados. Contudo, procedeu-se a um ensaio rápido para determinar o tipo de morte celular.

#### 4.4.1 - Avaliação da morte celular por ensaios de imunofluorescência

Neste estudo foi selecionado o composto que mostrou maior interação/estabilização com as estruturas do G-quadruplex uma vez que o nosso objetivo será atuar *in vitro* ao nível do G-quadruplex. Assim sendo, o composto SCM3 foi incubado com as células MCF-7 a uma concentração de 30 $\mu$ M durante 72 h. Ao fim desse período os núcleos celulares foram corados recorrendo a um marcador nuclear Hoechst (1 $\mu$ M PBS com 1% de TBS). Após incubação as células foram lavadas e fixadas para observação ao microscópio. Procedeu-se então à observação dos núcleos celulares e à pesquisa de núcleos com características apoptóticas (núcleos compactos e/ou fragmentados) ou necróticas (perda dos limites nucleares, visualização de pequenos fragmentos nucleares dispersos).



**Figura 33** - Imagens de fluorescência dos núcleos de células MCF-7: marcador Hoechst (1 $\mu$ M; 15 min). A - Células controlo (ausência de qualquer composto); B - células após incubação com SCM3 (30 $\mu$ M, 72h).

Após a avaliação de cerca de 10 campos da lamela não foi verificada a presença de células com características apoptóticas ou necróticas, apresentando os núcleos uma morfologia semelhante à das células controlo.



## Capítulo 5 - Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo principal a síntese de novos compostos químicos derivados do ácido litocólico com ação no G-quadruplex e consequente avaliação destes como potenciais agentes anticancerígenos.

A síntese teve como base o ácido litocólico devido à sua estrutura química rígida e ao facto de pertencer a uma família de compostos com atividade anticancerígena já comprovada. Para além deste facto, ao composto base foram adicionados anéis aromáticos e aminas de modo a possibilitar a interação com o G-quadruplex por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com as tétradas e interações electroestáticas com os *loops* ou *grooves*. Assim, foram sintetizados três compostos macrocíclicos pela adição de poliaminas ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  e  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ) passíveis de serem testados nas fases seguintes: interação com o G-Quadruplex e citotoxicidade celular.

Dos compostos sintetizados, seguiram para estudos de interação (através de CD-*melting*) dois dos macrociclos (SCM2 e SCM3). Estes, constituídos por diferentes aminas, com e sem oxigénio ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  e  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  respetivamente), possibilitaram compreender a importância das cadeias de amina para a interação com o G-quadruplex.

Nestes estudos, verificou-se que nenhum dos compostos foi capaz de alterar a topologia híbrida da *Tell22* nem a paralela do *c-MYC* uma vez que os espectros se mantiveram após a adição do composto. Contudo, o composto SCM3 estabilizou moderadamente a topologia híbrida G-quadruplex da *Tell22* e a topologia paralela do *c-MYC* em 1,76°C e 3°C, respetivamente. Este resultado foi corroborado no ensaio de FRET-*melting* realizado com a sequência *Tell21*. Neste ensaio 5  $\mu\text{M}$  deste composto (25 equivalentes) possibilitaram um aumento da temperatura de *melting* em cerca de 16°C.

Posteriormente, a ação anti proliferativa dos compostos sintetizados foi avaliada em células cancerígenas humanas da mama, próstata e glioma (MCF-7, LNCaP e U-87) e em células normais da derme humana (NHDF) pelo ensaio de viabilidade celular MTT.

O *screening* inicial demonstrou que os precursores SCDiol e SCDib demonstraram uma maior capacidade anti proliferativa, assim como, o macrociclo SCM5. Tendo em conta a primeira análise dos estudos concentração-resposta dos compostos, foi realizada a determinação do  $\text{IC}_{50}$  para os compostos que demonstraram maiores efeitos citotóxicos.

Assim, verificou-se que o SCDiol foi o composto com maior atividade citotóxica tendo-se obtido valores de  $IC_{50}$  de 6,85 e 3,71 para as células LNCaP e MCF-7, respetivamente. Igualmente o composto SCM5 demonstrou efeito citotóxico principalmente para as células LNCaP com um  $IC_{50}$  de 14,64. Tais resultados poderão evidenciar efeitos diferenciais dos compostos segundo os tipos celulares sendo por isso requeridos estudos mais abrangentes ou seja, com um maior número de linhas celulares.

Os ensaios de fluorescência para determinação da localização dos compostos não foram conclusivos uma vez que os compostos apresentavam comprimentos de onda de excitação não alcançáveis pelos microscópios disponíveis. Contudo, seguiram-se ensaios de fluorescência para determinar o tipo de morte celular causada pelos compostos de interesse.

Assim, apesar do composto SCM3 não evidenciar uma grande capacidade citotóxica, avançou-se para a sua avaliação a nível celular uma vez que revelou interação com as estruturas híbrida e paralela do G-quadruplexes da *Tel122* e *c-MYC*. Por microscopia de fluorescência as células tratadas com este composto encontravam-se idênticas ao controlo não se tendo observado células apoptóticas ou necróticas. Concluiu-se então que este composto não estaria a causar morte celular (necrose ou apoptose) mas possivelmente a inibir a proliferação das células cancerígenas uma vez que apresentava menor redução do MTT, indicativa de menor atividade mitocondrial. Contudo, ensaios mais específicos necessitam de ser realizados para comprovar esta hipótese assim como compreender o mecanismo envolvido nesse processo.

Em suma, através deste estudo, foi possível sintetizar vários derivados do ácido litocólico assim como avaliar a sua capacidade de interação/estabilização com o G-quadruplex. Para além disso, foi também possível avaliar a citotoxicidade/ capacidade anti proliferativa destes compostos em células cancerígenas. Deste modo, poderão ser executadas alterações estruturais nestes compostos com vista a potenciar a seletividade com o G-quadruplex. A partir dos compostos aqui estudados, poderão ser investigados os mecanismos de atuação envolvidos assim como poderá ser avaliado o seu potencial interesse terapêutico para a indústria farmacêutica.



## Capítulo 6 - Perspetivas Futuras

- Desenvolver sinteticamente derivados de ácido litocólico com aminas semelhantes à do composto SCM3 (cadeias propilo com 4 nitrogénios) pois este interagiu com o G-quadruplex.
- Alterar e/ou adicionar novos grupos funcionais (por exemplo anéis aromáticos) de modo a aumentar a seletividade e a capacidade de estabilização do G-quadruplex.
- Compreender se o efeito citotóxico dos compostos é temporário ou definitivo ou seja, averiguar se após o tratamento (72h) o número de células continua diminuído.
- Estudar se os compostos sintetizados são capazes de promover a morte das células cancerígenas ou diminuir a sua proliferação através de outros ensaios a nível celular como por exemplo o ensaio BRDU (5-bromo-2'-deoxiuridina) ou citometria de fluxo.
- Avaliar o tipo de morte celular provocado pelo composto SCM3 noutras linhas celulares.
- Alargar o estudo da viabilidade celular a outras linhas celulares.
- Estudar a eventual diminuição da atividade da enzima telomerase através do ensaio PCR *stop assay*.



## Bibliografia

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737-8.
2. Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2009 Apr;37(6):1713-25.
3. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(19):5402-15.
4. Du Y, Zhou X. Targeting non-B-form DNA in living cells. *Chem Rec*. 2013 Aug;13(4):371-84.
5. König SLB, Evans AC, Huppert JL. Seven essential questions on G-quadruplexes. *BioMol Concepts*. 2010;1:17.
6. Bates P, Mergny JL, Yang D. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *EMBO Rep*. 2007 Nov;8(11):1003-10.
7. Murat P, Singh Y, Defrancq E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem Soc Rev*. 2011 Nov;40(11):5293-307.
8. Adrian M, Heddi B, Phan AT. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods*. 2012 May;57(1):11-24.
9. Webba da Silva M. NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods*. 2007 Dec;43(4):264-77.
10. Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des*. 2009 Aug;74(2):101-20.
11. Vorlickova M, Kejnovska I, Sagi J, Renciuik D, Bednarova K, Motlova J, et al. Circular dichroism and guanine quadruplexes. *Methods*. 2012 May;57(1):64-75.
12. De Cian A, Guittat L, Kaiser M, Sacca B, Amrane S, Bourdoncle A, et al. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods*. 2007 Jun;42(2):183-95.
13. Jaumot J, Gargallo R. Experimental methods for studying the interactions between G-quadruplex structures and ligands. *Curr Pharm Des*. 2012;18(14):1900-16.
14. Renciuik D, Zhou J, Beaurepaire L, Guedin A, Bourdoncle A, Mergny JL. A FRET-based screening assay for nucleic acid ligands. *Methods*. 2012 May;57(1):122-8.
15. Tse WC, Boger DL. A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity. *Acc Chem Res*. 2004 Jan;37(1):61-9.
16. Monchaud D, Allain C, Teulade-Fichou MP. Development of a fluorescent intercalator displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 Sep 15;16(18):4842-5.
17. Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(9):2908-16.

18. Lam EY, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S. G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nat Commun.* 2013;4:1796.
19. Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Jan 12;366(1561):76-84.
20. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 2010 Sep 10;584(17):3819-25.
21. Xu Y. Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chem Soc Rev.* 2011 May;40(5):2719-40.
22. Wang Y, Patel DJ. Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry.* 1992 Sep 8;31(35):8112-9.
23. Phan AT, Patel DJ. Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J Am Chem Soc.* 2003 Dec 10;125(49):15021-7.
24. Keith WN, Jeffrey Evans TR, Glasspool RM. Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. *J Pathol.* 2001 Nov;195(4):404-14.
25. Goldman MA. The role of telomeres and telomerase in cancer. *Drug Discov Today.* 2003 Apr 1;8(7):294-6.
26. Wang Q, Liu JQ, Chen Z, Zheng KW, Chen CY, Hao YH, et al. G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. *Nucleic Acids Res.* 2011 Aug;39(14):6229-37.
27. Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):406-13.
28. Chen Y, Yang D. Sequence, stability, and structure of G-quadruplexes and their interactions with drugs. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2012 Sep;Chapter 17:Unit17 5.
29. Balasubramanian S, Hurley LH, Neidle S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Apr;10(4):261-75.
30. Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell.* 2012 Sep 28;151(1):56-67.
31. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11593-8.
32. Phan AT, Modi YS, Patel DJ. Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter. *J Am Chem Soc.* 2004 Jul 21;126(28):8710-6.
33. Chen BJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. Small molecules targeting c-Myc oncogene: promising anti-cancer therapeutics. *Int J Biol Sci.* 2014;10(10):1084-96.
34. Brooks TA, Hurley LH. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer.* 2010 Jun;1(6):641-9.
35. Roskoski R, Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 23;338(3):1307-15.

36. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 15;20(6):1692-703.
37. Wei D, Husby J, Neidle S. Flexibility and structural conservation in a c-KIT G-quadruplex. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(1):629-44.
38. Fernando H, Reszka AP, Huppert J, Ladame S, Rankin S, Venkitaraman AR, et al. A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene. *Biochemistry*. 2006 Jun 27;45(25):7854-60.
39. Todd AK, Haider SM, Parkinson GN, Neidle S. Sequence occurrence and structural uniqueness of a G-quadruplex in the human c-kit promoter. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(17):5799-808.
40. Ou TM, Lu YJ, Tan JH, Huang ZS, Wong KY, Gu LQ. G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*. 2008 May;3(5):690-713.
41. Bidzinska J, Cimino-Reale G, Zaffaroni N, Folini M. G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets. *Molecules*. 2013;18(10):12368-95.
42. Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, et al. Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res*. 1999 Feb 1;59(3):639-44.
43. Mikami-Terao Y, Akiyama M, Yuza Y, Yanagisawa T, Yamada O, Yamada H. Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 in K562 leukemic cells. *Cancer Lett*. 2008 Mar 18;261(2):226-34.
44. Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH, et al. The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2002 Jun;1(8):565-73.
45. Nagesh N, Buscaglia R, Dettler JM, Lewis EA. Studies on the site and mode of TMPyP4 interactions with Bcl-2 promoter sequence G-Quadruplexes. *Biophys J*. 2010 Jun 2;98(11):2628-33.
46. Liu H, Lv C, Ding B, Wang J, Li S, Zhang Y. Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 with photodynamic therapy in ovarian carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2014 Jul;8(1):409-13.
47. Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, Ohtani T, Yamada Y, Furihata K, et al. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc*. 2001 Feb 14;123(6):1262-3.
48. Kim MY, Vankayalapati H, Shin-Ya K, Wierzba K, Hurley LH. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc*. 2002 Mar 13;124(10):2098-9.
49. Binz N, Shalaby T, Rivera P, Shin-ya K, Grotzer MA. Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells. *Eur J Cancer*. 2005 Dec;41(18):2873-81.
50. Shamma MA, Shmookler Reis RJ, Li C, Koley H, Hurley LH, Anderson KC, et al. Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 15;10(2):770-6.
51. Tauchi T, Shin-Ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Shimamoto T, et al. Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human

leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene*. 2003 Aug 14;22(34):5338-47.

52. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaebe M, Lin A, Bliesath J, et al. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7653-61.

53. Kar A. *Medical Chemistry*. 4 ed: New age international (P) limited publishers; 2007.

54. John M. Beale J, John H. Block. Wilson and Gisvold's *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011.

55. Tian M, Zhang X, Li Y, Ju Y, Xiang J, Zhao C, et al. Inducement of G-quadruplex DNA forming and down-regulation of oncogene c-myc by bile acid-amino acid conjugate-BAA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2010 Mar;29(3):190-9.

56. Martinez JD, Stratagoules ED, LaRue JM, Powell AA, Gause PR, Craven MT, et al. Different bile acids exhibit distinct biological effects: the tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation. *Nutr Cancer*. 1998;31(2):111-8.

57. Im E, Choi SH, Suh H, Choi YH, Yoo YH, Kim ND. Synthetic bile acid derivatives induce apoptosis through a c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent process in human cervical carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2005 Nov 8;229(1):49-57.

58. Brassart B, Gomez D, De Cian A, Paterski R, Montagnac A, Qui KH, et al. A new steroid derivative stabilizes g-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells. *Mol Pharmacol*. 2007 Sep;72(3):631-40.

59. Averin AD, Ranyuk ER, Lukashev NV, Beletskaya IP. Synthesis of nitrogen- and oxygen-containing macrocycles--derivatives of lithocholic Acid. *Chemistry*. 2005 Nov 18;11(23):7030-9.

60. Giraldo R, Suzuki M, Chapman L, Rhodes D. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7658-62.

61. Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):2723-35.

62. De Cian A, Guittat L, Shin-ya K, Riou JF, Mergny JL. Affinity and selectivity of G4 ligands measured by FRET. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2005(49):235-6.